HOCHMOLEKULARE EISEN - PORPHYRINKOMPLEXE MIT AXIALEN N- UND S-LIGANDEN. SYNTHESE, SPEKTROSKOPISCHE EIGENSCHAFTEN, HYDROXYLIERUNGSREAKTIONEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
ERNST HEYER
aus Dettingen

1981

81 279

HOCHMOLEKULARE EISEN - PORPHYRINKOMPLEXE MIT AXIALEN N- UND S-LIGANDEN. SYNTHESE, SPEKTROSKOPISCHE EIGENSCHAFTEN, HYDROXYLIERUNGSREAKTIONEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
ERNST HEYER
aus Dettingen

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Juli 1981

Dekan:	Prof. Dr. E. Reinhard
1. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. P. Krauß
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Bayer

Abstract

HEYER, ERNST:

Hochmolekulare Eisen-Porphyrinkomplexe mit axialen N- und S-Liganden. Synthese, spektroskopische Eigenschaften, Hydroxylierungsreaktionen.

Ausgehend vom Enzym Cytochrom P_{450} und einem früher untersuchten niedermolekularen Modellsystem werden makromolekulare Enzymmodelle entwickelt. Dazu werden geeignete Polymere synthetisiert. Sie enthalten Komponenten des Enzyms - Stickstoff- und Schwefelliganden - als funktionelle Gruppen. Diese verschiedenen Polymere werden mit Hämin zu Hämopolymeren umgesetzt. Die koordinativen Verhältnisse am zentralen Eisenatom werden mit der ESR-Spektroskopie untersucht. Die ESR-Signale stimmen mit denen des Enzyms nahezu überein. Auch die Verschiebung der g-Werte des Enzyms bei Substratzugabe kann mit den Modellsystemen simuliert werden. Die polymeren Modellsysteme werden auf ihre katalytischen Fähigkeiten hin untersucht.
Anilin , Phenylessigsäure, Progesteron, Testosteron, Östradiol, Dopamin und Tryptophan werden als Substrate eingesetzt. Die polymeren Modellsysteme können die Substrate mit Hilfe von Luftsauerstoff und Reduktionsmitteln hydroxylieren. Dabei treten mit dem gleichen Substrat teilweise unterschiedliche Hydroxylierungsprodukte auf. Diese werden mit DC, HPLC, GC und GC-MS untersucht.

Im Vergleich zu ihren niedermolekularen Vorstufen bieten die polymeren Modellsysteme folgende Vorteile:
leichtere Abtrennbarkeit, größere Reaktionsgeschwindigkeiten, Einsatz in wässriger Phase.

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Privatdozent Dr. Peter Krauß in der Zeit von Januar 1978 bis Oktober 1980 am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer,
Herrn Privatdozent Dr. Peter Krauß, danke ich herzlich, daß er mir diese Arbeit ermöglicht hat und mir bei der Durchführung stetes Interesse und großzügige Unterstützung zuteil werden ließ.

Herrn Professor Dr. Ernst Bayer danke ich herzlich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und für finanzielle Unterstützung.

Herrn Professor Dr. H.P. Hagenmaier und Herrn Dr. K. Malcher danke ich für viele wichtige Hinweise und anregende Diskussionen.

Dem Land Baden-Württemberg danke ich für ein Graduiertenstipendium.

Für Helga und Mathias

INHALTSVERZEICHNIS

A.	EINLEITUNG	1
1.	Übersicht über das Enzym Cytochrom P_{450}	1
1.1.	Vorkommen und Funktion von Cytochrom P_{450}	1
1.2.	Physikalisch-chemische Eigenschaften von P_{450}	3
1.2.1.	Stereochemie des Aktivzentrums und Spinzustände	3
1.2.2.	Lichtabsorptionsspektroskopie	4
1.2.3.	ESR-Spektroskopie	5
1.3.	Mechanismus der P_{450}-katalysierten Monooxigenierung	6
2.	Modellsysteme für Cytochrom P_{450}	8
2.1.	Kriterien für die Darstellung eines Modells	8
2.2.	Problemstellung	11
B.	ALLGEMEINER TEIL	12
1.	Entwicklung des P_{450}-Modellsystems	12
1.1.	Niedermolekulare Modelle	12
1.2.	Warum polymere Modelle	13
2.	Synthese von geeigneten Polymeren	14
2.1.	Polymerisation geeigneter Monomere	15
2.1.1.	Poly-N-Vinylimidazol	15
2.1.2.	Polyacrylcystein	15
2.1.3.	Copolymere	16
2.1.3.1.	Acrylamid/Vinylimidazol-Copolymer	17
2.1.3.2.	Acrylamid/Bisacrylcystamin-Copolymer	18
2.1.3.3.	Acrylamid/Vinylimidzaol/Bisacrylcystamin-Copolymer	19
2.2.	Einführung der Komponenten in synthetische Polymere	20

2.2.1.	Veresterung von Polyvinylalkohol mit Histidin und Cystein	20
2.2.2.	Umsetzung eines Ethylen/Maleinsäureanhydrid-Copolymers mit Imidazol	21
2.3.	Natürliche Polymere	22
2.3.1.	Keratin	22
3.	Modellsysteme für Cytochrom P_{450}	23
3.1.	System I Poly-N-Vinylimidazol/Hämin	23
3.2.	System II Acrylamid/Vinylimidazol-Copolymer/Hämin System IIa Acrylamid/Vinylimidzaol/Hämin-Copolymer	24
3.3.	System III Acrylamid/Vinylimidazol/Bisacrylcystamin/Hämin-Copolymer	26
3.4.	System IV 1-Carboxyl-2-Imidazolylcarbonyl-Ethylen/Ethylen-Copolymer/Hämin	27
3.5.	System V Keratin/Hämin	28
3.6.	Weitere polymere Häminkomplexe	30
4.	ESR-Spektroskopie	30
4.1.	Allgemeiner Überblick über die ESR-Spektroskopie von paramagnetischen Metallkomplexen	30
4.2.	ESR-Spektroskopie am Enyzm P_{450} und Modellsystemen	32
4.2.1.	Aktivzentrum des Enzyms	32
4.2.2.	ESR-Signalverschiebungen durch Substrate	32
4.2.3.	ESR-Messungen an polymeren Häminkomplexen	36
4.2.3.1.	System I Poly-N-Vinylimidzaol/Hämin	36
4.2.3.2.	System II Acrylamid/Vinylimidazol-Copolymer/Hämin	38
4.2.3.3.	System III Acrylamid/Vinylimidazol/Bisacrylcystamin/Hämin-Compolymer	39
4.2.3.4.	System IV 1-Carboxyl-2-Imidazolylcarbonyl-Ethylen/Ethylen-Copolymer/Hämin	41

4.2.3.5.	System V Keratin/Hämin	43
4.2.3.6.	Polyacrylcystein/Hämin	44
5.	Substratumsätze	46
5.1.	Hydroxylierungen mit System IV	47
5.1.1.	Anilin als Substrat	47
5.1.2.	Phenylessigsäure als Substrat	50
5.1.3.	Steroide (Progesteron, Testosteron und Östradiol) als Substrate	51
5.1.3.1.	Progesteron als Substrat	51
5.1.3.2.	Testosteron und Östradiol als Substrate	55
5.1.4.	Dopamin als Substrat	56
5.2.	Hydroxylierungen mit System V	57
5.2.1.	Phenylessigsäure als Substrat	57
5.2.2.	Tryptophan als Substrat	59
5.3.	Hydroxylierungen mit System II	60
5.3.1.	Anilin als Substrat	60
5.4.	Hydroxylierungen mit System III	60
5.4.1.	Anilin als Substrat	60
5.5.	Hydroxylierungen mit System VI	61
5.6.	Hydroxylierungen mit Natriumperjodat	62
5.6.1.	System IV Substrat Anilin	63
6.	Asymmetrische Hydroxylierungen	64
6.1.	Niedermolekulare Modellsysteme	65
6.2.	Polymere Modellsysteme	66
6.2.1.	Polyacrylcystein/Hämin	66
6.2.2.	System V Keratin/Hämin	67
7.	Vergleiche zwischen den einzelnen Systemen	71
7.1.	Substrat Anilin	71
7.2.	Substrat Phenylessigsäure	72
8.	Diskussion und Ausblick	74

C.	EXPERIMENTELLER TEIL	77
1.	Chemikalien und Materialien	77
2.	Geräte	77
3.	Methoden	78
3.1.	Dünnschichtchromatographie	78
3.2.	ESR-Spektroskopie	79
3.3.	Hochdruckflüssigkeitschromatographie	80
4.	Synthesen	80
4.1.	Poly-N-Vinylimidazol	80
4.2.	Poly-N-Vinylimdazol/Hämin (System I)	82
4.3.	Polyacrylcystein	82
4.4.	Acrylamid/Vinylimidazol-Copolymer	84
4.5.	Acrylamid/Vinylimidazol-Copolymer/ Hämin (System II)	84
4.6.	Acrylamid/Vinylimidazol/Hämin-Copolymer (System IIa)	85
4.7.	Acrylamid/Bisacrylcystamin-Copolymer	85
4.8.	Acrylamid/Vinylimidazol/Bisacrylcystamin-Copolymer	87
4.9.	Acrylamid/Vinylimidazol/Bisacrylamid/ Hämin-Copolymer (System III)	88
4.10.	Veresterung von Polyvinylalkohol mit Cystein und Histidin	88
4.11.	System VI Polyvinylalkohol-Cystein-Histidin-Ester/Hämin	89
4.12.	Umsetzung des Copolymers aus Ethylen und Maleinsäureanhydrid mit Imidazol	89
4.13.	Umsetzung des obigen Polymers mit Hämin (System IV)	90
4.14.	Keratin-Isolierung	90
4.15.	System V Keratin/Hämin	

5.	Hydroxylierungsreaktionen	91
5.1.	Hydroxylierungen mit System IV	91
5.1.1.1.	Anilin als Substrat, Thioglykolsäure als Schwefelligand	91
5.1.1.2.	Mercaptoäthanol als Schwefelligand	91
5.1.2.	Phenylessigsäure als Substrat	92
5.1.3.	Steroide als Substrate	92
5.1.3.1.	Progesteron	92
5.1.3.2.	Testosteron und Östradiol	93
5.1.4.	Dopamin als Substrat	94
5.2.	Hydroxylierungen mit System V	95
5.2.1.	Phenylessigsäure als Substrat	95
5.2.2.	Tryptophan als Substrat	97
5.3.	Hydroxylierungen mit System II und IIa (Anilin als Substrat)	98
5.4.	Hydroxylierungen mit System III (Anilin als Substrat)	99
5.5.	Hydroxylierungen mit System VI (Anilin als Substrat)	99
5.6.	Hydroxylierungen mit Natriumperjodat (Anilin als Substrat)	100
D.	ZUSAMMENFASSUNG	101
E.	LITERATURVERZEICHNIS	105

ABKÜRZUNGEN

P_{450}	Cytochrom P_{450}
Cys	Cystein
DC	Dünnschichtchromatographie
DMF	Dimethylformamid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMA	Ethylen/Maleinsäureanhydrid-Copolymer
ESR	Elektronensprinresonanz
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektroskopie
Hämin	Häminchlorid
His	Histidin
HPE	Hydroxyphenylessigsäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IMI	Imidazol
IR-	Infrarot-
Met	Mercaptoäthanol
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
PFP	Perfluorpropionyl
TEMED	Tetramethylethylendiamin
UV	Ultraviolett

A. EINLEITUNG

1. Übersicht über das Enzym Cytochrom P_{450}

1.1. Vorkommen und Funktion von P_{450}

Die oxidativen Veränderungen im lebenden Organismus werden - wie viele andere Reaktionen - durch Enzyme katalysiert.
Von ihrer Funktion her lassen sich die am oxidativen Metabolismus von Fremdstoffen beteiligten Enzyme in Gruppen einteilen.
Oxidasen entziehen ihren Substraten Wasserstoff oder Elektronen, während Oxygenasen (1) durch Einbau von molekularem Sauerstoff in das Substrat eine Oxidation bewirken.
Bei den Oxygenasen muß man zwischen Di- und Mono-oxygenasen unterscheiden (2).
Dioxygenasen bauen beide Atome des Sauerstoffmoleküls in das Substrat (RH) ein. Bei den Monooxygenasen wird nur ein O-Atom zur Substratoxydation verwendet, während das andere mit einem Wasserstoffdonor (DH_2) Wasser bildet.

$$RH + DH_2 + O \longrightarrow ROH + D + H_2O$$

Aufgrund dieser Eigenschaft werden die Monooxygenasen auch als "gemischt funktionelle Oxydasen" (mixed funktion oxydases) bezeichnet (3).
Das wohl wichtigste Enzym aus der Gruppe der Monooxygenasen ist das Cytochrom P_{450}, das 1958 von Klingenberg (4) und Garfinkel (5) in den Mikrosomen der Rattenleberzellen entdeckt wurde.
Es fiel auf durch sein spektrales Verhalten:
Nach Reduktion mit Natriumdithionit und Begasen mit Kohlenmonoxid tritt im Differenzspektrum der Mikrosomen eine Absorptionsbande bei 450 nm auf. Alle bisher bekannten Kohlenmonoxidkomplexe von Eisen-Porphyrinverbindungen absorbierten wesentlich kurzwelliger. Aufgrund dieser ungewöhn-

lichen Bande erhielt das Hämoproteid den vorläufigen Namen Cytochrom P_{450}. Besser wäre vielleicht die Bezeichnung P_{450}-Monooxygenase, da Cytochrome Elektronenüberträger sind.

Nachfolgende Untersuchungen haben gezeigt, daß Cytochrom P_{450} ein Hauptbestandteil des fremdstoffmetabolisierenden Enzymsystems im endoplasmatischen Retikulum (ER) der Leberzelle ist. Außer im ER wurden ähnliche Cytochrom P_{450}-haltige Enzymsysteme in den Mitochandrien der Nebenniere gefunden, wo sie die Hydroxylierung von Steroiden katalysieren (6).
Auch in dem Bakterienstamm "Pseudomonas Putida" ist ein derartiges Enzymsystem enthalten und dient dort zur Hydroxylierung von Campher (7-9).

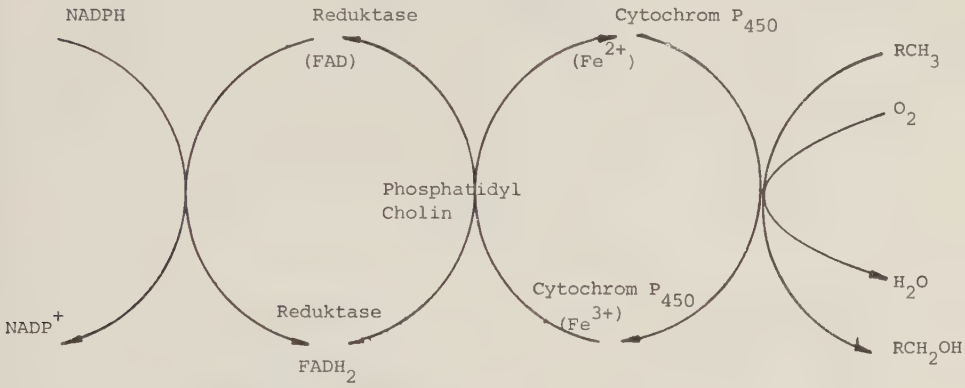
In den darauffolgenden Jahren fand man das Enzym außer in Säugetieren auch in den Mikrosomen und Mitochondrien von Insekten (10), Hefen (11) und höheren Pflanzen (12).
In fast allen Fällen konnte dem gefundenen Cytochrom P_{450} eine Hydroxylierungsreaktion zugeordnet werden.
Eine wichtige Funktion des Enyzms ist die Umwandlung lipophiler Stoffe wie Arzneimittel, polycyclische Kohlenwasserstoffe, Alkane, Fettsäuren und Steroide in polarere Folgeprodukte, die dann aus dem Körper ausgeschieden werden können.
Einige Beispiele für solche Hydroxylierungsreaktionen

Aromatische Hydroxylierung:	Anilin (13)
Aliphatische Hydroxylierung:	Cyclohexan (14)
N-Desalkylierung:	Äthylmorphin (15)
O-Desalkylierung:	Chlorpromazin (17)

Die Eigenschaften des reinen Enzyms wurden hauptsächlich von Gunsalus et al. (18), Yu et al. (19) und Dus et al. (20) erforscht.

Lu und Coon rekonstituierten das Monooxygenase-System aus seinen aus der Zellmembran gelösten Komponenten, wobei die Aktivität erhalten blieb.

Abbildung 1: Elektronen-Transport-Kette

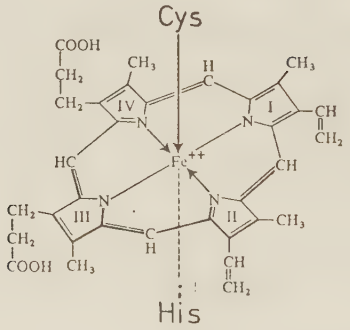


1.2. Physikalisch-chemische Eigenschaften von P_{450}

1.2.1. Stereochemie des Aktivzentrums und Spinzustände

Die prosthetische Gruppe des Cytochrom P_{450} ist das Protoporphyrin IX. In dessen Eisenkomplex bilden die Stickstoffatome der vier Pyrrolringe eine Ebene der oktaedrischen Koordinationsphäre des zentralen Eisen-Ions aus.

Abbildung 2:
Schematisches Aktivzentrum
von Cytochrom P_{450}

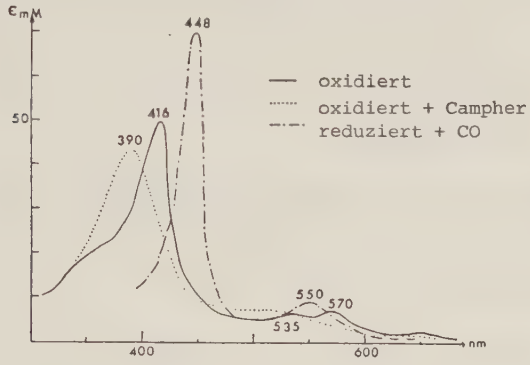


An der fünften Koordinationsstelle des Eisens sitzt das Schwefelatim eines Cysteinrestes der Proteinkette (21). Welcher Ligand die sechste Stelle einnimmt ist noch umstritten. Es könnte ein Histidinrest (22), eine OH-Gruppe (23) oder ein Wassermolekül (24) sein.
Das Eisen kann in den oktaedrischen Komplexen als Fe^{2+} (reduzierte Form) oder Fe^{3+} (oxidierte Form) vorliegen. Cytochrom P_{450} von Säugetieren wird immer in der oxidierten Form isoliert (25), wobei low-spin und high-spin Komplexe auftreten können.
Diese wurden mit ESR- und VIS-Spektroskopie nachgewiesen.

1.2.2. Lichtabsorptions-Spektroskopie

Typisch für das VIS-Spektrum des Cytochrom P_{450} ist die Soretbande (390 - 420 nm).
Die Zugabe von Substraten zum Enzym verursacht eine Verschiebung dieser Bande. Während Typ I Substrate (z.B. Campher) die Soretbande nach kürzeren Wellenlängen verschieben, bewirken Typ II Substrate (z.B. Anilin) eine Rotverschiebung (26,27).

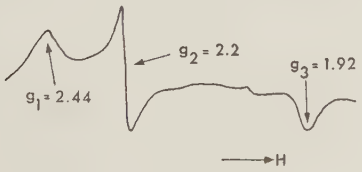
Abbildung 3: Die Absorptionsspektren von P_{450}-Campher und seinen Komplexen (7)



1.2.3. ESR-Spektroskopie

Das ESR-Spektrum von C. P_{450} zeigt dessen vorwiegenden low-spin Charakter. Es tritt ein low-spin Signal des dreiwertigen Eisens auf mit g-Werten bei $g_1 = 2.44$; $g_2 = 2.26$; $g_3 = 1.92$.

Abbildung 3: g-Werte des ESR-Spektrums von P_{450} aus Lebermikrosomen



Analog zu den Verschiebungen im VIS-Spektrum treten mit Substraten auch Unterschiede im ESR-Spektrum auf. Bei Zugabe von Anilin zu P_{450} weitet sich das Spektrum auf, während z.B. 17 α-Hydroxyprogesteron eine Tieffeld-Verschiebung der g_3-Komponente verursacht (28).

1.3. Mechanismus der P_{450}-katalysierten Monooxigenierung

Wie verläuft nun im Einzelnen die Aktivierung und Übertragung des Sauerstoffmoleküls auf das Substrat?
Der Mechanismus besteht aus sechs mittlerweile gut bekannten Schritten:

1) Die Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes.
   Dabei geht der sechsfach koordinierte low-spin Komplex in einen fünffach-koordinierten high-spin Komplex über (29). Gleichzeitig ändert sich vermutlich die Tertiärstruktur des Proteins.

2) Der Enzym-Substrat-Komplex wird reduziert.
   ($Fe^{3+} \longrightarrow Fe^{2+}$). Das Elektron stammt entweder von einem Flavoprotein oder Eisen-Schwefel Protein. In Anwesenheit von Substraten ist die Reduktionsgeschwindigkeit - die bestimmend für die Gesamtreaktion ist - um Größenordnungen schneller als ohne Substrat (30).

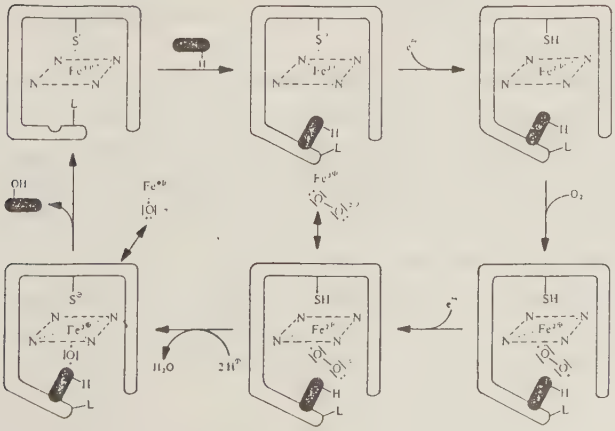
3) Bindung von Sauerstoff. Der resultierende O_2-Komplex ist ähnlich gebaut wie die bekannten Oxy-Komplexe von Hämoglobin, Myoglobin, Peroxidase oder Tryptophan Dioxygenase.

4) Übertragung eines zweiten Elektrons auf den Oxy-Komplex. Der Sauerstoff erreicht dabei formal die Superoxidstufe. Dieser Schritt ist noch nicht so gut erforscht, doch gibt es mehrere experimentelle Beweise (31,32).

5) Durch Abspaltung von Wasser oder einem OH^- Ion entsteht die eigentliche aktive Form des Sauerstoffs; die sogenannte "Oxenoide Spezies" FeO^{3+}. Diese Spezies hat elektrophile Eigenschaften und wird durch die elektronenschiebende Wirkung des Schwefel-Atoms in Trans-Stellung zum Sauerstoffatom stabilisiert. Dieses Spezies bildet sich auch, wenn Iodosobenzol zu oxidiertem P_{450} gegeben wird (33).

6) Bei der nun folgenden Hydroxylierung wird das Sauerstoffatom des FeO^{3+}-Komplexes auf das Substratmolekül übertragen; das jetzt polarere hydroxylierte Substrat verläßt das Enzym, und der sechste Ligand koordiniert wieder am Fe-Atom.

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Hydroxylierung durch P_{450} Monooxygenasen:
links oben: oxidiertes low-spin Eisen (III)
Mitte oben: Substratkomplex des oxidierten P_{450}
Von rechts oben im Uhrzeigersinn: erste Elektronenzuführung, Oxygenierung, zweite Elektronenzuführung, Ausbildung der oxenoiden Spezies, Hydroxylierung.
H = Substrat



2. Modellsystemefür Cytochrom P_{450}

In den letzten 25 Jahren wurden eine Vielzahl von chemischen Modellsystemen für Cytochrom P_{450} entwickelt. Der Hauptgrund dafür war vor allem die Aufklärung des Mechanismus der Sauerstoffaktivierung. Ein weiterer Gesichtspunkt war, mittels spektroskopischer Daten Aufschluß über das Aktivzentrum zu erhalten.

Das eigentliche Ziel der hier vorliegenden Arbeit war - neben dem mechanistischen Aspekt - vor allem durch Nachahmung des biologischen Vorbildes ein Modellsystem zu erzeugen, das die Enzymreaktion katalysieren kann.

2.1. Kriterien für die Darstellung des Modells

Für die Darstellung eines Enzymmodells bieten sich grundsätzlich verschiedene Wege an:

Kennt man durch Röntgenstrukturanalyse die Struktur des Aktivzentrums eines Enzyms, so kann man versuchen, ein Imitat des Naturstoffes herzustellen. Das natürliche System wird vereinfacht nachgebaut. Z.B. kann der Proteinanteil auch durch leichter zugängliche Polymere ersetzt werden. Dieses Modell wird anschließend auf seine katalytischen Fähigkeiten untersucht. Das Ziel dieser Methode ist, die Enzymreaktion mit einem synthetischen Modell nachzuvollziehen.
Oft ist aber der Naturstoff schlecht isolierbar, zumindest sind keine Röntgenstrukturdaten bekannt. In diesem Fall ist man auf moderne physikalisch-chemische Meßmethoden angewiesen. (UV/VIS, IR, NMR, ESR, Mößbauer, EXAFS).
Über die spektroskopischen Befunde erhält man Kenntnisse über Struktur und Reaktionsablauf am Aktivzentrum des Enzyms. In diesem Fall gibt es dann zwei Möglichkeiten, ein Modellsystem zu synthetisieren:

1) Man synthetisiert ein System, dessen physikalische Daten (z.B. ESR Parameter) mit dem Naturstoff übereinstimmen. Das kann dazu führen, daß man ganz andere Liganden verwenden muß, als sie im Naturstoff vorliegen.
Dieser Weg wurde für die Ferredoxine, eine Gruppe von Elektronenüberträgern, beschritten (34-36).

2) Man synthetisiert ein Modell, das die gleichen Reaktionen katalysieren kann, wie das Naturprodukt, aber ganz anderer chemischer Natur ist.
Kobalt(II)-Polyamin-Komplexe als Modelle für Hämoglobin sind ein Beispiel hierfür (37,38).

Sehr viele der in den letzten Jahren entwickelten Modellsysteme für P_{450} fallen in die zweite Gruppe. Der Hauptgesichtspunkt war die Sauerstoffaktivierung. Sie unterscheiden sich teilweise stark vom Naturstoff:

Fentons Reagenz	H_2O_2/Fe^{2+}	(39)
Udenfriend System	O_2/Fe^{2+}/EDTA/Ascorbinsäure	(40)
Hamilton System	H_2O_2/Fe^{2+}/Brenzkatechin	(41)
Ullrich System	O_2/Fe^{2+}/2 Mercaptobenzoesäure	(42)
Peroxytrifluoressigsäure	CF_3COOH/H_2O_2	(43)
Zinn(II) Hydrogenphosphat	$Sn^{2+}/HPO_4^{2-}/O_2$	(44)

Bei einer weiteren Gruppe von Modellsystemen für Cytochrom P_{450} wollten die Autoren vor allem eine Übereinstimmung zwischen den physikalischen Daten der Modellsysteme und denen des Naturstoffes erreichen. Dadurch waren Aussagen über die Stereochemie des Aktivzentrums möglich:

Bayer/Röder:	Hämin/Thiole	(45)
Blumberg/Peisach:	Hämin, Thiole, N-Basen	(46)
Chang, Dolphin:	Hämin/Butylmercaptid	(47)
Traylor:	Hämin-di-N,N'-Mercaptopropyl-propionsäureamid	(48)

Diese Systeme wurden also nach dem unter 1) genannten Prinzip entwickelt.

Da die sterischen Verhältnisse (Atomabstände, Winkel) im Modellsystem und im Enzym niemals genau gleich sind, kann man anhand von spektroskopischen Daten nur grobe Aussagen über die Qualität der Modelle machen. Sie müssen deshalb auch anhand der zu katalysierenden Reaktion überprüft werden.
Die Produktverteilung stellt dabei ein wichtiges Kriterium dar. Nur wenige Autoren wurden beiden Kriterien (spektroskopische Daten und Betrachtung der katalysierten Reaktion) gerecht:

Ullrich:	Hämindimethylester/Para-Nitro-Thiophenolat + Nitromethan	(49)
Sakurai:	Hämin/Thiole + Substrate	(50)
Krauß, Heyer:	Hämin/Met/Imi + Anilin	(51)

Eine Sonderstellung nimmt das System von Groves ein. Hier wird die Eigenschaft von P_{450} als Oxentransferase (Ullrich) zur Hydroxylierung und Epoxydierung ausgenutzt (52).

Im System Hämin/Met/Imi (51) sind verschiedene Kriterien eines Modellsystems erfüllt:

1) Nähe zum Natursystem: Eisenporphyrin, Schwefelligand, Stickstoff-Ligand.
2) ESR-Daten, die denen von P_{450} selbst entsprechen, als auch ähnliche Verschiebungen der g-Werte bei Substratzugabe zeigen.

3) Mit Anilin als Substrat treten ähnliche Hydroxylierungsprodukte wie beim Enzym selbst auf.

2.2. Problemstellung

Ausgehend von diesen niedermolekularen Systemen wurden nun folgende Problemfelder untersucht:

- Läßt sich ein derartiges System zu einem brauchbaren Hydroxylierungskatalysator weiterentwickeln?
- Mit welchen Mitteln läßt sich eine Fixierung des Systems erreichen?
- Wie kann man das ganze System in H_2O verwenden, um es etwa in der Abwasserreinigung einzusetzen?
- Kann man durch geeignete "Maßschneiderung" eine spezifische Hydroxylierung von Substraten erreichen?
- Läßt sich durch Einsatz asymmetrischer Liganden am Hämin eine asymmetrische Hydroxylierung durchführen?

B. ALLGEMEINER TEIL

1. Entwicklung des P_{450}-Modellsystems

1.1. Niedermolekulare Modelle

Das niedermolekulare P_{450}-Modellsystem aus Met, Imi, Hämin in DMF (System I) ist in der Lage, Anilin zu para- und ortho-Aminophenol zu hydroxylieren oder z.B. Testosteron in eine ganze Reihe von Hydroxylierungsprodukten zu überführen. Die Hydroxylierung erfolgt also sowohl am Aromat als auch am Aliphat und zwar in ähnlicher Weise wie beim Enzym selbst. Doch die Ausbeuten der Reaktion sind nicht befriedigend. Außerdem läßt sich das System selbst schlecht von den Produkten abtrennen. Schließlich wäre es auch nicht möglich, dieses System in wässriger Lösung einzusetzen (53).
Um zu prüfen, ob mit kovalent an das Hämin gebundenen Liganden die Hydroxylierungsausbeuten steigen, wurden zwei Histaminreste über die Propionsäurefunktionen an das Porphyrin geknüpft (System II). In Gegenwart von Mercaptoäthanol lieferte das System mit Anilin zwar bessere Ausbeuten als System I, doch war es nicht möglich, das System leicht abzutrennen. Außerdem konnte nicht in wässriger Lösung gearbeitet werden.
Die Fixierung von System II durch Adsorption an Al_2O_3 brachte in Gegenwart von Mercaptoäthanol gute Ausbeuten an Hydroxylierungsprodukten. Doch mit Wasser und auch anderen Lösungsmitteln wurde das "Häminbishistaminpropionsäureamid" wieder vom Al_2O_3 eluiert (54).

1.2. Warum polymere Modelle?

Die Schwierigkeiten mit diesen Systemen - Ausbeute, Abtrennen, Verwendung von Wasser als Lösungsmittel - legten nahe, Enzymmodelle zu synthetisieren, bei denen die Liganden am Hämin Teil eines Polymeren sind.
Es ist bekannt, daß das Verhalten eines Metallkomplexes durch die Bindung an ein Makromolekül entscheidend beeinflußt werden kann (55).
Außerdem liegt im natürlichen Enzymsystem auch ein Makromolekül vor. Das hochmolekulare Protein hat dabei eine wichtige Funktion. Es kontrolliert die Reaktivität des Metallkomplexes, so daß sehr spezifische katalytische Eigenschaften resultieren. In letzter Zeit wurde verstärkt damit begonnen, synthetische polymere Katalysatoren zu erforschen, für die Enzyme als Vorbilder dienen. Man versucht, die hohe Spezifität und gute katalytische Wirksamkeit der Natursysteme mit chemischen Modellen nachzuahmen und für chemische Reaktionen auszunutzen (56).

Welche Vorteile versprechen derartige polymere Systeme?

1) "Polymereffekt": Durch die Konformation des Polymers läßt sich eine spezielle sterische Umgebung um das aktive Zentrum schaffen. Diese relativ starre geometrische Anordnung läßt sich beeinflussen durch Veränderungen am Polymer, an den funktionellen Liganden oder Substituenten am Porphyrin. Durch Einbau zusätzlicher funktioneller Gruppen lassen sich unter Umständen Nachbargruppeneffekte erzielen, die bei niedermolekularen, freibeweglichen Liganden unmöglich sind.
   Somit hat man verschiedene "Werkezeuge" in der Hand, um eine Reaktion zu beschleunigen oder in eine stereospezifische Richtung zu lenken. Durch Verwendung chiraler Polymere läßt sich gegebenenfalls eine asymmetrische Induktion erreichen.

2) Dadurch, daß die Liganden (relativ fest) am Eisenatom fixiert sind, dürften die Hydroxylierungsausbeuten größer sein (Entropieeffekt). (Siehe System I und II). Außerdem ist die Synthese eines "polymeren Liganden" in vielen Fällen einfacher als das kovalente Verknüpfen von Liganden mit dem Porphyrin.

3) Abtrennen des Katalysators:

a) Unlösliche Polymere lassen sich leicht vom Lösungsmittel, den Substraten und den Metaboliten abfiltrieren.

b) Lösliche Polymere kann man mittels Ultrafiltration von den niedermolekularen Reaktionspartnern trennen. Bei niedermolekularen Modellsystemen bereitet das Abtrennen des Katalysators wesentlich größere Schwierigkeiten.

4) Bei geeigneter Wahl des Trägerpolymers kann man die Reaktion im gewünschten Lösungsmittel (z.B. Wasser) durchführen, da das Porphyrin solubilisiert werden kann.

2. Synthese von geeigneten Polymeren

Um Polymere herzustellen, welche die Liganden des Enzymsystems enthalten, bieten sich prinzipiell drei Synthesewege an:

a) Polymerisation geeigneter Monomere

b) Einführen der Komponenten in synthetische Polymere

c) Einsetzen von natürlichen Polymeren, welche eine Komponente bereits enthalten.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde auf allen drei Wegen versucht, ein geeignetes Hydroxylierungsmodellsystem zu entwickeln.

2.1. Polymerisation geeigneter Monomere

2.1.1. Poly-N-Vinylimidazol (PVI)

Poly-N-Vinylimidazol wurde hergestellt, um als Ligand für Hämin ein Polymer zu erhalten, das außer Imidazol keine weiteren koordinationsfähigen Gruppen besitzt. Darüberhinaus ist Poly-N-Vinylimidazol wasserlöslich.
Dieses Polymer wurde durch radikalische Polymerisation von N-Vinylimidazol hergestellt.

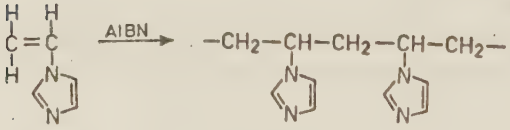


Abbildung 5: Poly-N-Vinylimidazol

2.1.2. Polyacrylcystein

Polyacrylcystein wurde aus verschiedenen Gründen hergestellt:

- Polyacrylcystein enthält nur den fünften Ligand des natürlichen Enzyms - Cystein - als koordinationsfähige Gruppe.
- Auch dieses Polymer ist im reduzierten Zustand wasserlöslich.
- Der Cysteinrest ist optisch aktiv. Ein Modellsystem aus Hämin und Polyacrylcystein könnte vielleicht asymmetrische Hydroxylierungen ermöglichen.

Für die Darstellung von Polyacrylcystein wurde zunächst unlösliches Bisacrylcystin synthetisiert:
Die Aminogruppen von Cystin wurden mit Acrylchlorid zum Säureamid umgesetzt.

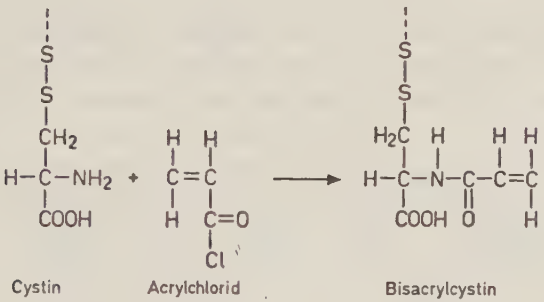


Abbildung 6

Bisacrylcystin wurde dann radikalisch zu Polyacrylcystin polymerisiert. Die Disulfidgruppen des unlöslichen Polyacrylcystins wurden in wässriger Suspension mit Mercaptoäthanol zu SH-Gruppen reduziert. Dabei löst sich das Polymer. Das Reaktionsgemisch wurde durch Ultrafiltration gereinigt. Die SH-Gruppenbestimmung mit Jodessigsäure (57) ergab einen Gehalt von 85 % der Theorie. Ida et al. berichten von 79 % Gehalt an SH-Gruppen (58).

2.1.3. Copolymere

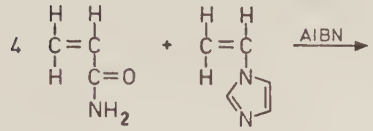
Für die folgenden drei Copolymere wurde Acrylamid als Hauptbestandteil der Polymerkette verwendet, um eine gute Löslichkeit in Wasser zu gewährleisten. Polyacrylamid ist sehr gut wasserlöslich. Außerdem verläuft die Polymerisation von Acrylamid sehr gut. Die verwendeten Lösungsmittel

(Wasser, Äthanol und Methanol) lassen sich leicht vom Polymeren entfernen, sind billig, leicht zugänglich und ungiftig.
Um Copolymere zu erzeugen, die man in lipophilen Lösungsmitteln verwenden kann, bietet sich Styrol als Hauptkomponente an.
Der kurze Abstand der funktionellen Gruppen von der Hauptpolymerkette ist ein Nachteil dieser "Vinyl"-Copolymere. Bei einem größeren Abstand könnte das Hämin besser mit den Liganden koordinieren, da diese dann beweglicher wären. Andererseits ist die Polymerisationsfähigkeit der Vinylmonomere am besten.
Mit diesem Copolymerisationsprinzip kann man also verschiedene Kombinationen von polymeren Liganden relativ einfach erzeugen. Der Einsatz von speziell substituierten Monomeren (z.B. 2-Phenyl-N-Vinylimidazol) böte die Möglichkeit, sterische Effekte in unmittelbarer Nähe des Eisenatoms im Hämin zu erzielen.
Durch die Wahl der Grundmonomeren, sowie die Variation der Mischverhältnisse mit der Imidazol- oder Cysteinkomponente kann also der lipophile oder hydrophile Charakter des Enzymmodells beeinflußt werden.

2.1.3.1. Acrylamid/Vinylimidazol-Copolymer

Dieses Copolymer wurde zum einen hergestellt, um die Wasserlöslichkeit im Vergleich zu Poly-N-vinylimidzaol zu verbessern. Die polaren Amidgruppen machen dieses Molekül hydrophiler. Zum anderen war beabsichtigt, durch die Verdünnung der Imidazolgruppen in einem Copolymer mit Hämin Komplexe zu erhalten, bei denen nur eine freie Koordinationsstelle mit Imidazol besetzt ist. Fuhrhop et al. berichten bei einem Copolymer aus Styrol und Vinylimidazol von derartigen Monokomplexen (59). Die sechste Koordinationsstelle könnte dann mit verschiedenen Mercaptanliganden besetzt werden.

Die beiden Komponenten Acrylamid und Vinylimidazol wurden im Verhältnis 4:1 copolymerisiert.



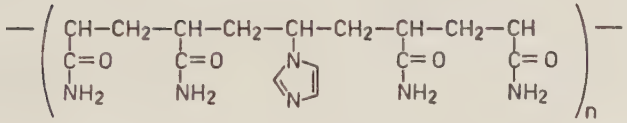


Abbildung 7 : Acrylamid/Vinylimidazol-Copolymer

2.1.3.2. Acrylamid/Bisacrylcystamin-Copolymer

Dieses Copolymer wurde synthetisiert, um einen polymeren Schwefelliganden zur Verfügung zu haben, bei dem die einzelnen SH-Gruppen weiter voneinander entfernt sind. Es wurde erwartet, daß dies die Komplexbildung mit Hämin begünstigt. Die in wässriger Lösung auftretende Gelbildung ist allerdings hinderlich für die Herstellung eines funktionsfähigen Hydroxylierungsmodellsystems. Der Sauerstoff und die Substrate müßten durch das Gel diffundieren um an das katalytische Zentrum zu gelangen.
Für die Synthese dieses Copolymers mußte zunächst aus Acrylchlorid und Cystamin Bisacrylcystamin hergestellt werden. Dieses wurde dann mit Acrylamid im Verhältnis 1:4 copolymerisiert.

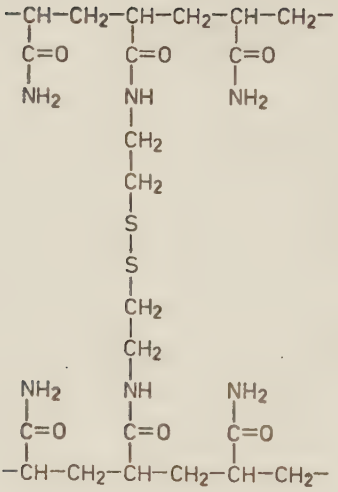


Abbildung 8: Acrylamid/Bisacrylcystamin-Copolymer

2.1.3.3. Acrylamid/Vinylimidazol/Bisacrylcystamin-Copolymer

Diese Verbindung wurde hergestellt, um beide in Cytochrom P_{450} vermuteten Hämin-Liganden in ein Polymer einzubauen. Dazu wurden Vinylimidazol, Bisacrylcystamin und Acrylamid im Verhältnis 2:1:10 in wässriger Lösung copolymerisiert. Bei der Reaktion bildete sich ein Gel. Die Gelbildung hängt stark von der Konzentration der Komponenten ab. Bei einem Versuch mit einer verdünnteren Lösung bildete sich kein Niederschlag. Das entstandene Gel läßt sich mit Reduktionsmitteln wieder zu einer Lösung umwandeln. Mit Mercaptoäthanol und Dithionit geht das Polymer beim Erwärmen sehr gut in Lösung.

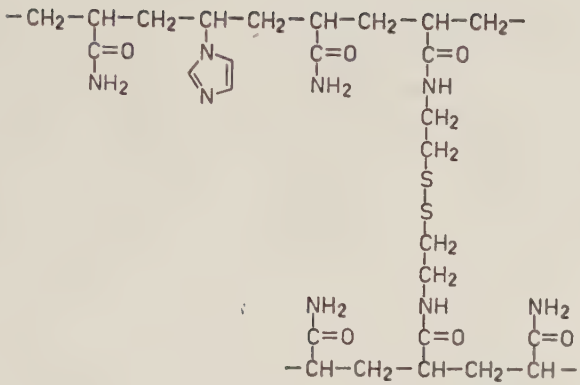


Abbildung 9 : Acrylamid/Vinylimidazol/Bisacrylcystamin-Copolymer

2.2. Einführung der Komponenten in synthetische Polymere

2.2.1. Veresterung von Polyvinylalkohol mit Histidin und Cystein

Auch dieses Polymer wurde hergestellt, weil damit durch eine relativ einfache Reaktion die beiden axialen Liganden fixiert werden können. Die koordinierenden Gruppen sind für Hämin zugänglicher als z.B. im Copolymer aus Acrylamid, Vinylimidazol und Bisacrylcystamin (2.1.3.3.), da ihr Abstand zur Hauptkette größer ist.
Polyvinylalkohol ist gut wasserlöslich, sodaß in Wasser gearbeitet werden kann.
Zur Darstellung dieses Polymers wurde Polyvinylalkohol in wässriger Lösung sauer mit Histidin und Cystein verestert.

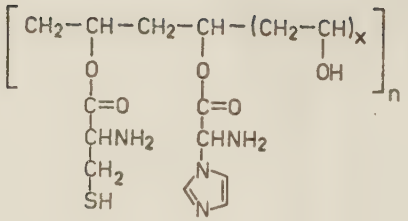


Abbildung 10: Polyvinylalkohol partiell verestert mit Histidin und Cystein

Die Elementaranalyse ergab, daß etwa jede achte OH-Gruppe des Polyvinylalkohols mit Cystein oder Histidin verestert wurde.
Dieses Polymer ist zwischen pH 5 und pH 13 unlöslich. Wird es in stark alkalischem oder saurem Milieu gelöst, läßt sich je nach pH-Wert zwischen 7 und 9 eine feinere oder gröbere Ausflockung erreichen.

2.2.2. Umsetzung eines Ethylen/Maleinsäureanhydrid-Copolymers mit Imidazol

Mit einem Copolymer aus Ethylen und Maleinsäureanhydrid können Enzyme und Proteine immobilisiert werden. Dabei reagieren Amino- oder Iminogruppen mit den Säureanhydridgruppen zu Amiden oder Imiden.
Als Quervernetzungsmittel wird dort Hexamethylendiamin verwendet (60). Dieses Reaktionsprinzip kann man auch zur Fixierung von Histidin, Cystein oder Imidazol anwenden:

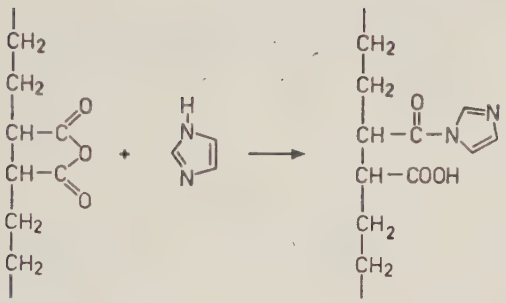


Abbildung 11

Dieses unlösliche Polymer, das beim Einsatz von Imidazol entsteht, enthält neben den eingebauten Imidazolgruppen noch freie Carboxylgruppen in direkter Nachbarschaft. Es wurde erwartet, daß sich dies auf die Koordination mit Hämin sowie die Substratbindung auswirkt.
Die Synthese dieses Polymers ist einfach und geht schnell.

2.3. Natürliche Polymere

2.3.1. Keratin

Der Einsatz von Biomolekülen ist eine dritte Möglichkeit um Polymere mit geeigneten funktionellen Gruppen zu erhalten. Als Beispiel für Biomoleküle mit hohem Schwefelgehalt wurde Keratin ausgewählt. Je nach Herkunft enthält Keratin bis zu 20 % Cystin, welches zu Cystein reduziert werden kann.
Der Anteil von Histidin liegt allerdings nur bei etwa 1 %.
Keratin wurde isoliert und gereinigt um festzustellen, wie sich die spezielle Konformation dieses Proteins auf die Komplexbildung mit Hämin auswirkt.

3. Modellsysteme für Cytochrom P_{450}

Aus den im vorhergehenden Kapitel beschriebenen Polymeren, Hämin und verschiedenen Mercaptanen wurden Modellsysteme für Cytochrom P_{450} aufgebaut.

3.1. System I: Poly-N-Vinylimidazol/Hämin

Zu einer Lösung von Poly-N-Vinylimidazol in Wasser wurde unter Rühren eine alkalische wässrige Häminlösung zugegeben. Der entstandene Komplex aus PVI und Hämin ist dunkelrot, er flockt nach kurzer Zeit aus. Dieser Niederschlag wurde abfiltriert und mehrfach mit Wasser ausgewaschen. Das getrocknete Material ist sehr hart und läßt sich im Mörser zu einem feinen Pulver zerreiben.
Obwohl PVI und Hämin in Wasser bei pH 7,5 löslich sind, ist die Komplexverbindung unlöslich. Vermutlich werden die einzelnen PVI-Ketten über Hämin koordinativ miteinander verbrückt, was die Unlöslichkeit bewirken würde.

I

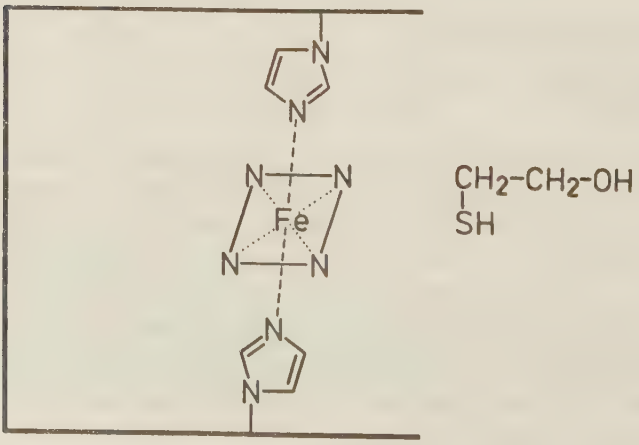


Abbildung 12 : System I

Zu dem pulverisierten Komplex wurde Mercaptoäthanol gegeben. Dabei verdrängt der Schwefelligand einen Imidazolrest vom Eisenatom. Die N-Fe-N-Koordination geht in eine N-Fe-S-Koordination über (siehe Kap. 4.).
Prinzipiell können zu diesem fixierten Hämin/Imidazol-Komplex verschiedene Mercaptane zugegeben werden. Dadurch kann das Modellsystem variiert werden. Obwohl der polymere Komplex in Wasser unlöslich ist, kann Wasser als Lösungsmittel für die Hydroxylierungsreaktion verwendet werden, indem mit der Suspension des Modellsystems gearbeitet wird.

3.2. System II: Acrylamid/Vinylimidazol-Copolymer/Hämin

Zu einer ultrafiltrierten Lösung des Copolymers aus Acrylamid und Vinylimidazol wurde eine Häminlösung gegeben. Es entstand eine rote Lösung der polymeren Komplexverbindung, die in Lösung blieb. Die Ultrafiltration dieser Lösung ergab ein farbloses Filtrat. Der polymere Komplex wurde demnach von der Membran zurückgehalten. Anscheinend bewirkten die geringere Konzentration der Imidazolgruppen im Copolymer, sowie die polaren Amidgruppen die Löslichkeit des polymeren Komplexes. Zu dieser Lösung wurde Mercaptoäthanol zugegeben. Der Schwefelligand verdrängte auch hier einen Imidazolliganden (siehe ESR-Spektrum Kap. 4).
Das System ist in der Lage, Substrate zu hydroxylieren. Außerdem ist es in Wasser löslich und kann durch Ultrafiltration abgetrennt werden.

System II a:

In einem anderen Versuch wurde Hämin über seine Vinylgruppen mit in das Polymer eingebaut. Hämin, Acrylamid und Vinylimidazol wurden radikalisch copolymerisiert. Der polymere Häminkomplex fiel beim Eingießen in ein Wasser-Aceton-Gemisch aus. Der Niederschlag konnte nach dem Trocknen pulverisiert werden. Mit diesem unlöslichen Hämopolymer wurden Hydroxylierungen durchgeführt, wobei der zugegebene Schwefelligand auch als Lösungsmittel für das Substrat diente.

II

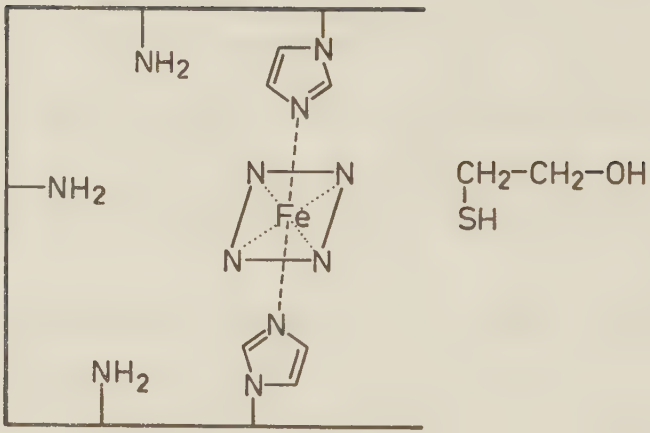


Abbildung 13: System II

IIa

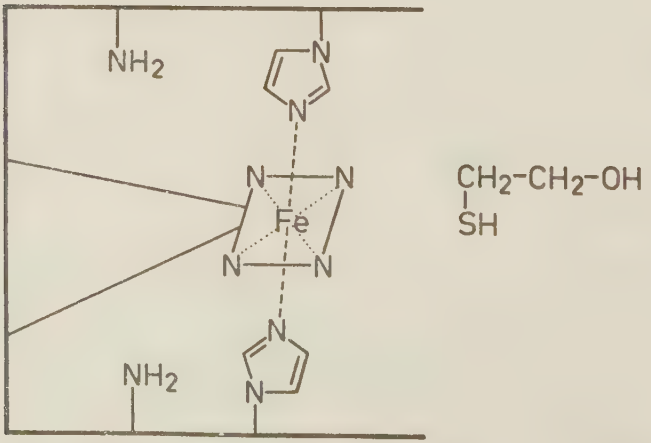


Abbildung 14 : System IIa

3.3. System III: Acrylamid/Vinylimidazol/Bisacrylcystamin/Hämin-Copolymer

Zur Darstellung eines Modellsystems, bei dem alle Komponenten Bestandteil eines Polymers sind, wurden Acrylamid, Vinylimidazol, Bisacrylcystamin und Hämin in wässriger Lösung copolymerisiert. Es bildete sich ein rotes Gel, welches mit Natriumdithionit oder Mercaptoäthanol reduktiv in Lösung gebracht werden konnte.
Diese rote Lösung wurde ultrafiltriert. Das Filtrat war farblos. Das zeigt, daß das Hämin fest am Polymer gebunden ist. Die koordinativen Verhältnisse am Eisenatom wurden mit Hilfe der Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie untersucht (siehe Kap. 4).

III

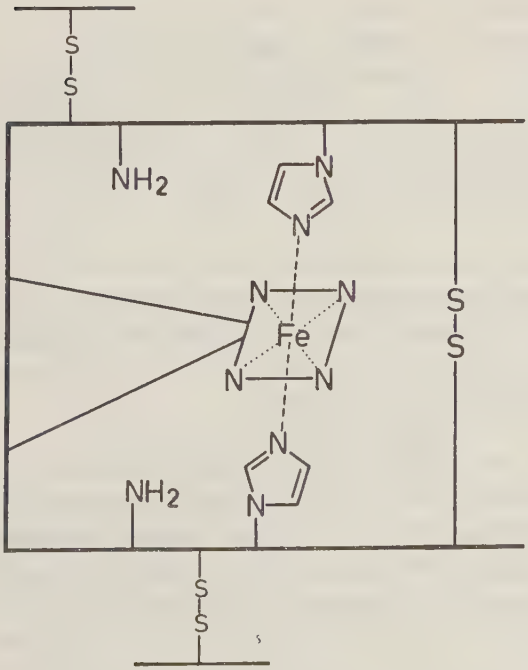


Abbildung 15 : System III

Dieses System erfüllt also folgende Bedingungen:

1) Beide Liganden des Hämins sind am Polymer fixiert.
2) Das System ist im reduzierten Zustand wasserlöslich.
3) Das System kann durch Ultrafiltrationen vom zugegebenen Substrat und den Metaboliten abgetrennt werden.

Um die Festigkeit der koordinativen Bindung der Liganden am Hämin zu prüfen, wurde zu einer Lösung von reduziertem Acrylamid/Vinylimidazol/Bisacrylcystamin-Copolymer (2.1.3.3.) Hämin gegeben. Die Ultrafiltration zeigt, daß das Hämin bereits durch die koordinative Bindung so fest am Polymer haftet, daß es nicht ausgewaschen wird.

3.4. System IV: 1-Carboxyl-2-Imidazolylcarbonyl-Ethylen/Ethylen-Copolymer/Hämin

Das mit Imidazol umgesetzte Copolymer aus Ethylen und Maleinsäureanhydrid wurde in Wasser suspendiert. Dazu wurde eine Lösung von Hämin gegeben. Nach kurzer Zeit setzte sich ein flaumiger tiefrot gefärbter Niederschlag ab. Der Überstand war farblos. Hämin wurde also koordinativ an das Polymer gebunden. Das ESR-Spektrum zeigt klar die N-Fe-N-Koordination am Eisenatom (siehe Kap. 4).

Zu der wässrigen Suspension dieses polymeren Hämin-Bisimidazol-Komplexes wurden Mercaptoäthanol, Cystein oder Thioglykolsäure als Schwefelliganden zugegeben und Substrate umgesetzt. Mit $NaJO_4$ als Oxendonor kann dieses Modellsystem ebenfalls Hydroxylierungen katalysieren.

Der zerriebene feste Häminkomplex wurde auch direkt zu verschiedenen flüssigen Mercaptanen zugegeben. Einerseits dienten diese als Lösungsmittel für die Substrate, andererseits als sechster Ligand für das Eisenatom. Auch mit diesem System konnten Substrate hydroxyliert werden.

IV

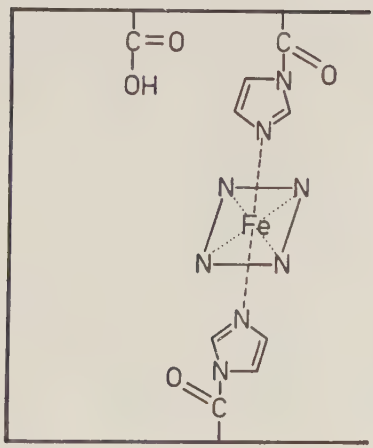


Abbildung 16 : System IV

Der Unterschied zu System I besteht darin, daß das Polymer noch Carboxylgruppen in Nachbarstellung zu den Imidazolresten hat. Diese können mit Substraten in Wechselwirkung treten.
Im Gegensatz zu System II ist System IV in Wasser zwar nicht löslich, doch kann man es als heterogenen Katalysator für die Hydroxylierung wässriger Substratlösungen verwenden.

3.5. System V: Keratin/Hämin

Zu einer gereinigten reduzierten wässrigen Keratinlösung wurde Hämin zugegeben. Die Lösung färbte sich braun und war klar. Aus dem ESR-Spektrum (siehe Kap. 4) ist ersichtlich, daß Hämin über zwei Cysteinreste koordinativ an das Polymer gebunden wird.

V

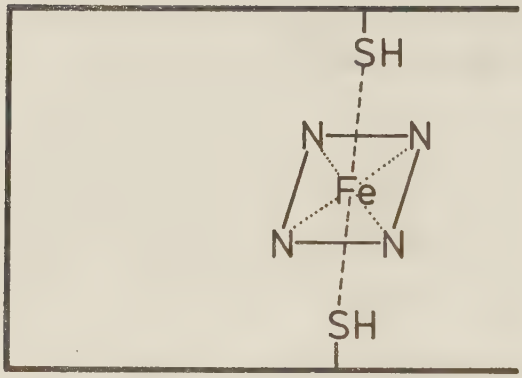


Abbildung 17: System V

Als Reduktionsmittel für die Hydroxylierungsreaktionen wurden Mercaptane eingesetzt (Thioglycolsäure, Mercaptoäthanol). Dieses System kann verschiedene Substrate mit sehr guten Ausbeuten hydroxylieren. Es ist auch leicht abtrennbar. Entweder wird das Protein bei pH 4.1 ausgefällt oder das Reaktionsgemisch wird ultrafiltriert.
Anhand dieses Beispiels wird deutlich, daß auch natürliche Polymere als Komplexbildner für Hämin eingesetzt werden können. Außer Keratin gibt es vermutlich noch mehrere Proteine mit funktionellen Gruppen, welche am Hämin als axiale Liganden auftreten können. Somit kann die Vielfalt der verschiedenen Proteinkonformationen ausgenutzt werden, um unterschiedliche sterische Umgebungen am Hämin zu erhalten. Interessant wäre auch, ob sich zwischen den spektralen Änderungen und den Hydroxylierungseigenschaften eines Protein-Hämin-Komplexes irgendwelche Zusammenhänge finden lassen. Vergleiche der Meßergebnisse und der Metabolitenmuster mit Cytochrom P_{450} selbst führen vielleicht zu weiteren Kenntnissen über die Umgebung am Aktivzentrum des Enzyms.

3.6. Weitere polymere Häminkomplexe

1.) Zu einer Suspension von mit Cystein und Histidin verestertem Polyvinylalkohol wurde Hämin gegeben. Es setzte sich ein grünlicher Niederschlag ab (System VI). Der Überstand war klar. Das Hämin wurde also an das Polymer gebunden. Nach der Zugabe von Natriumdithionit wurde der flockige Niederschlag rot. Die Zugabe von Anilin zu diesem System verursachte eine Farbvertiefung. Nachdem diese Suspension einige Stunden gerührt wurde, war sie wieder grün. Erneute Zugabe von Dithionit führte wieder zur Rotfärbung. Dieser Farbwechsel ließ sich über mehrere Tage wiederholen. Aus ESR-Untersuchungen ging nicht eindeutig hervor, wie das Hämin an das unlösliche Polymer gebunden wurde. Das System ist jedoch in der Lage, Anilin zu hydroxylieren.

2.) Zu einer reduzierten und ultrafiltrierten Lösung von Polyacrylcystein in Wasser wurde Hämin zugegeben. Die Lösung färbte sich braun. Hämin wurde koordinativ über zwei Cysteinreste an das Polymer gebunden. Auch bei pH 6 blieb die Lösung klar.
Mit diesem System wurde Phenylessigsäure umgesetzt. Es sollte untersucht werden, ob eine asymmetrische Hydroxylierung stattfindet (siehe Kap. 4).

4. ESR-Spektroskopie

4.1. Allgemeiner Überblick über ESR-Spektroskopie von paramagnetischen Metallkomplexen

Die Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (ESR) ist eine Methode, mit der Moleküle, die ungepaarte Elektronen besitzen, untersucht werden können. In der hier vorliegenden Arbeit handelt es sich um Messungen an Molekülen, die aufgrund ihres Eisengehaltes in paramagnetischer Form vorliegen können.

Aus der Lage der einzelnen Signale im ESR-Spektrum und aus seiner Struktur sind Rückschlüsse auf die Umgebung des paramagnetischen Zentrums möglich. Die Aufhebung der räumlichen Entartung spiegelt sich in der Aufspaltung der g-Faktoren wieder. Die g-Faktoren (quantenmechanische Konstanten) hängen ab von der Zahl der ungepaarten Elektronen und dem effektiven Magnetfeld am paramagnetischen Zentrum.

ESR-Messungen an Übergangsmetallen zeichnen sich durch folgende Merkmale aus:

a) Starke Spin-Bahn-Kopplung bewirkt eine große Anisotropie. Dadurch werden die g-Faktoren sehr weit aufgespalten (von g=0 bis g=9; der g-Faktor für das freie Elektron ist g=2).

b) Die Aufspaltung der g-Faktoren hängt sehr stark von der Umgebung des paramagnetischen Ions ab. Insbesondere die Art der Liganden und ihre geometrische Anordnung haben darauf großen Einfluß.

c) Die sehr kurzen Reaktionszeiten der angeregten Zustände erfordern eine Verlagerung des Boltzmann-Gleichgewichts zugunsten des Grundzustandes. Deswegen kann man oft erst bei sehr tiefen Temperaturen (flüssiger Stickstoff, flüssiges Helium) eine Resonanz beobachten.

c) Es können nur paramagnetische Ionen gemessen werden. Fe^{2+} low-spin-Komplexe mit den 6 d-Elektronen in den 3 t_{2g} Orbitalen liefern kein ESR-Signal.

Mit der ESR-Spektroskopie kann man den Oxydationsgrad eines Ions feststellen, da unterschiedliche Gesamtspins resultieren. Ebenso kann zwischen low-spin und high-spin Komplexen unterschieden werden, da deren Elektronenverteilung unterschiedlich ist.
Da die g-Wertverschiebung von der räumlichen Umgebung des Znetralatoms abhängt, kann man bei vorliegenden Werten Rückschlüsse auf die Geometrie der Liganden am Zentralatom ziehen. Mit der ESR-Spektroskopie hat man somit ein

Instrument zur Verfügung, mit dem Veränderungen in der engsten Umgebung eines paramagnetischen Zentrums verfolgt werden können.

4.2. ESR-Spektroskopie am Enzym P_{450} und Modellsystemen

4.2.1. Aktivzentrum des Enzyms

Das Enzym Cytochrom P_{450} wurde schon 1962 mit ESR vermessen (61). Doch konnte man damals das Spektrum noch nicht interpretieren. Mason vermutete aufgrund anderer Fakten eine Hämin-Mercaptan-Wechselwirkung als Ursache für dieses ESR-Signal (62,63).
Die ESR-Untersuchungen von Bayer et.al. (64, 46) an Hämin-Thiol-Komplexen und Hämoglobin-Thiol-Komplexen zeigten jedoch, daß das Aktivzentrum vermutlich eine Cys-Häm-His-Koordination besitzt.
In letzter Zeit ist die Natur des sechsten Liganden jedoch wieder umstritten. Ullrich zeigte mit ESR-Messungen, daß auch eine OH-Gruppe an der sechsten Koordinationsstelle des Hämin in Frage kommt (23).
Andererseits stützen Blumberg und Peisach die These, daß an der sechsten Koordinationsstelle ein Stickstoffligand sitzt. Kristallfeldanalysen von ESR-Daten und EXAFS-Messungen legen diese Vermutungen nahe (46, 65).

4.2.2. ESR-Signalverschiebungen durch Substrate

Wenn Substrate zu P_{450} gegeben werden, dann ändert sich das ESR-Spektrum. Typ II-Substrate (z.B. Anilin) weiten das Spektrum auf, Typ I-Substrate (z.B. Steroide) verringern die Aufspaltung der g-Werte.

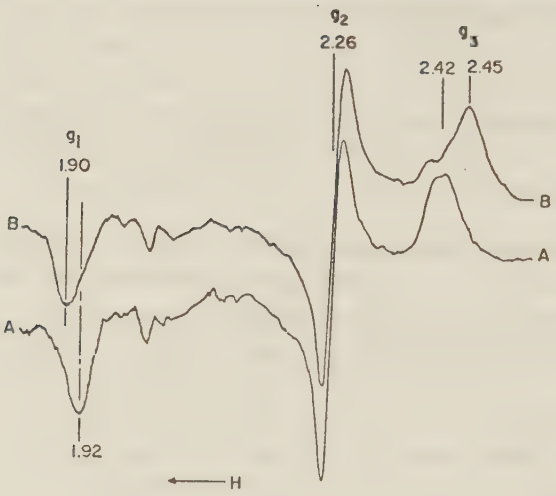


Abbildung 18: ESR-Spektrum von Cytochrom P_{450} mit und ohne Anilin (28)
A ohne Anilin; B + 5 mM Anilin

Das System Hämin/Mercaptoäthanol/Imidazol (51,53) ist nun in der Lage, sowohl das ESR-Spektrum von P_{450}, als auch die Signalverschiebungen bei Substratzugabe zu reproduzieren.
Baut man das System schrittweise auf, so erhält man folgende ESR-Spektren:

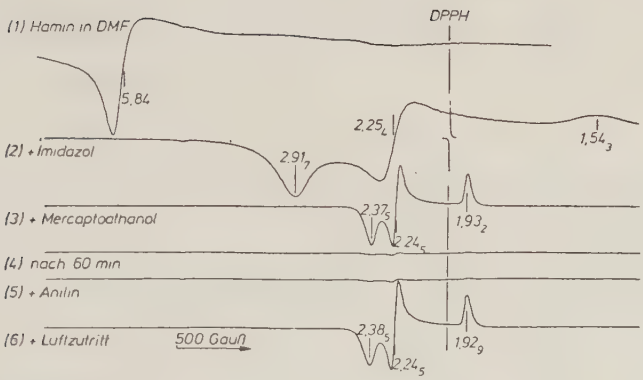


Abbildung 19: ESR-Spektren des Systems Häminchlorid/ Imidazol/Mercaptoäthanol/Anilin

1 Häminchlorid in DMF gelöst, ergibt das typsiche Spektrum eines high-spin Fe(III) Porphyrins.
Der g-Wert beträgt 5,84

2 Mit Imidazol geht das Fe(III) Porphyrin in einen low-spin bis -Imidazol Fe(III) Porphyrin Komplex über. Die drei g-Werte betragen g_1 = 2,91; g_2 = 2,25; g_3 = 1,45. Die Differenz zwischen g_1 und g_3 beträgt Δ = 1.37.

3 Die Zugabe von Mercaptoäthanol führt schließlich dazu, daß die Aufspaltung der g-Werte des low-spin Fe(III) Signals kleiner wird. Die Werte liegen nun bei g_1 = 2,37; g_2 = 2.24_5; g_3 = $1,93_2$. Die Differenz zwischen g_1 und g_3 beträgt Δ = $0,44_3$.

Diese Stufe entspricht der des oxidierten Cytochrom P_{450}. Die Werte des natürlichen Enzyms, das aus Lebermikrosomen gewonnen wurde, liegen bei g_1 = 2,42; g_2 = 2,26; g_3 = 1,92 (28).

Die Differenz beträgt also $\Delta = 0.50$.
Berücksichtigt man, daß die Lage der g-Werte vom Lösungsmittel abhängt, so kann man von einer guten Übereinstimmung des Modellsystems mit den Daten des Enzyms sprechen.

4 Im Laufe einer Stunde verschwindet das ESR Signal

5 Es tritt auch bei anaerober Zugabe von Anilin nicht wieder auf.

Das Eisen ist zur II-wertigen Stufe reduziert worden:

$$2\ Fe^{3+}(Porph)\ Cl^- + 2\ RSH \longrightarrow 2\ Fe^{2+}(Porph) + RSSR + 2\ HCl$$

Da Fe^{2+} mit seinen 6 d Elektronen im starken oktaedrischen Ligandenfeld 3 doppelt besetzte t_g Orbitale aufweist, ist es durch die ESR-Spektroskopie nicht erfaßbar. Der Gesamtspin beträgt s = o.

6 Erst Belüftung führt wieder zur Ausbildung eines low-spin Fe(III) Signals. Allerdings ist jetzt die Aufspaltung der g-Werte wieder größer geworden.
$g_1 = 2.38_5$ $g_2 = 2.24_5$ $g_3 = 1.92$ $g_1-g_3 = 0.45_6$

Das Substrat Anilin muß also mit dem Fe-Porphyrin-System in Wechselwirkung getreten sein. Das entspricht also der Beobachtung am P_{450} aus Lebermikrosomen.
Hier wurde das low-spin Signal beim Versetzen der Proben mit Anilin aufgeweitet (siehe Abb. 19).
$g_1 = 2.45$ $g_2 = 2.26$ $g_3 = 1.90$ $g_1-g_3 = 0.55$.

Diese Erscheingung wurde von Schenkmann et al. als Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes (Typ II) interpretiert, in Analogie zu den Blauverschiebungen der Soretbanden in den Lichtabsorptionsspektren (27).

4.2.3. ESR-Messungen an polymeren Häminkomplexen

4.2.3.1. System I Poly-N-Vinylimidazol/Hämin

Die Komplexverbindung aus Poly-N-vinylimidazol und Hämin wurde in festem Zustand ESR-spektroskopisch untersucht:

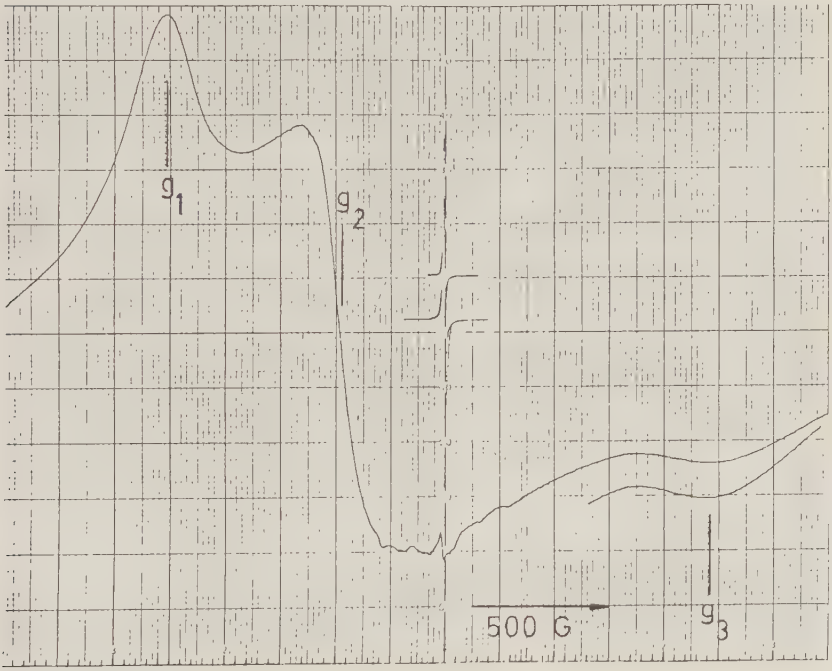


Abbildung 20:
ESR-Spektrum System I

Aus der Aufspaltung der g-Werte in $g_1 = 2.81$ $g_2 = 2.25$ $g_3 = 1.56_9$ geht hervor, daß Hämin von zwei Imidazolresten koordinativ gebunden wird. Die Zugabe von Mercaptoäthanol

zu dem Hämin/PVI-Komplex verursacht eine Verschiebung der g-Werte.

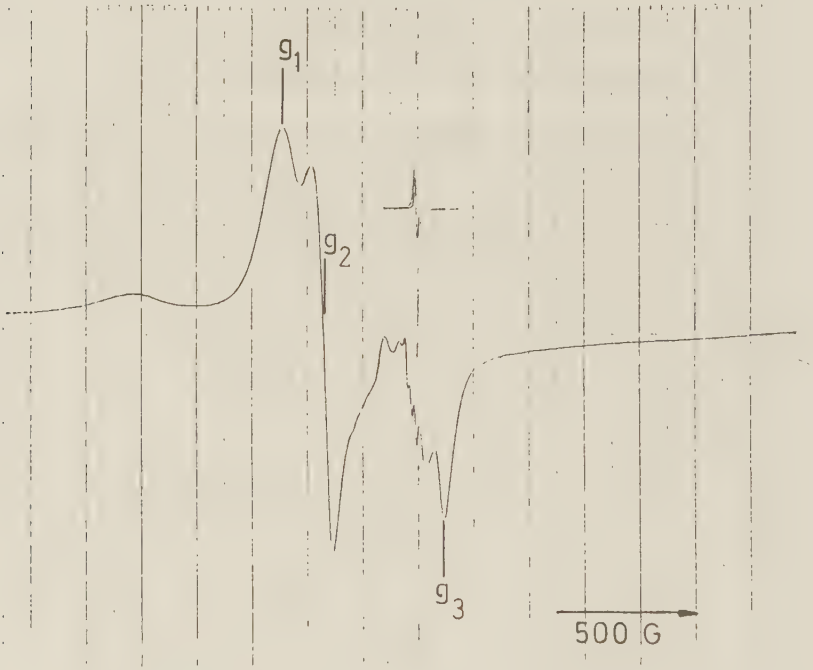


Abbildung 21:
ESR-Spektrum System I + Met

Die g-Wert-Aufspaltung in $g_1 = 2.34$ $g_2 = 2.21_5$ und $g_3 = 1.93$ ist ein Hinweis dafür, daß ein Imidazolrest durch Mercaptoäthanol ersetzt wurde. Es liegt jetzt eine S-Fe-N-Koordination vor.

4.3.2.2. System II Acrylamid/Vinylimidazol-Copolymer/Hämin

Eine wässrige Lösung der Komplexverbindung wurde mit der ESR-Spektroskopie untersucht. Das Spektrum zeigt eine N-Fe-N-Koordination am Hämin:

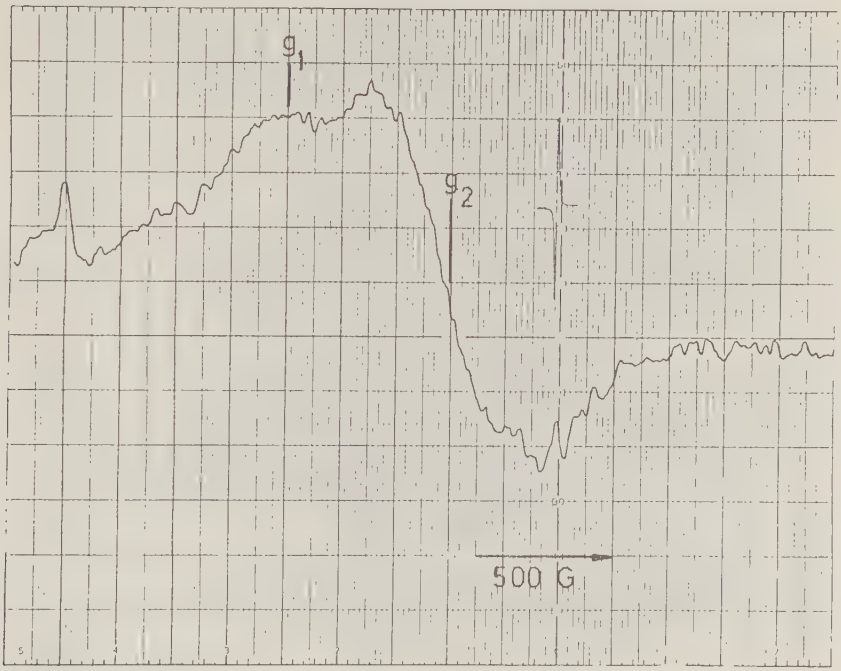


Abbildung 22:
ESR-Spektrum System II

Zu dieser wässrigen Lösung wurde Mercaptoäthanol gegeben. Das Spektrum zeigt, daß ein Stickstoffligand durch den Schwefelliganden verdrängt wurde (N-Fe-S-Koordination).

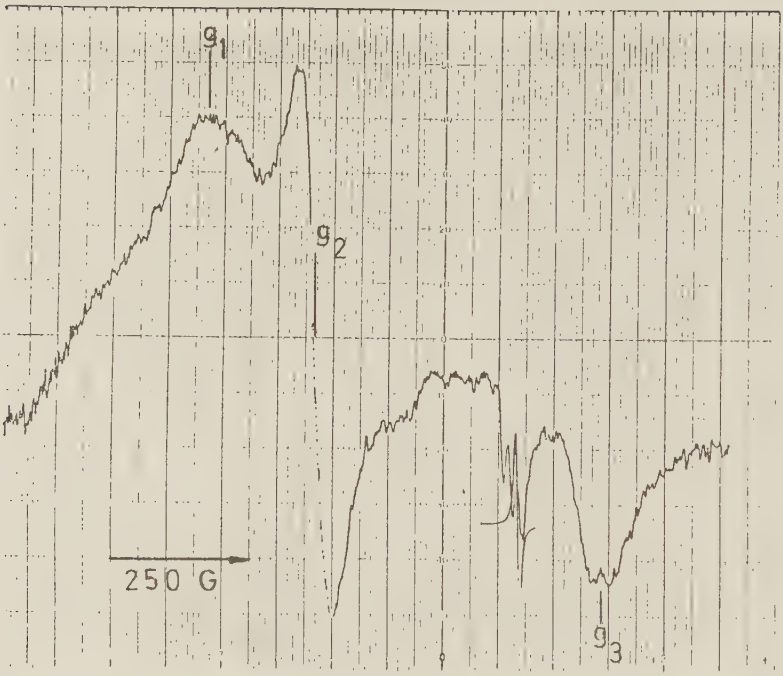


Abbildung 23:
ESR-Spektrum System II + Met

g-Werte N-Fe-N : $g_1 = 2.80$; $g_2 = 2.26_2$; g_3 = nicht nachweisbar.
g-Werte S-Fe-N : $g_1 = 2.42_2$; $g_2 = 2.24_4$; $g_3 = 1.91_9$

4.2.3.3. System III Acrylamid/Bisacrylcystamin/Vinylimidazol/Hämin-Copolymer

Das Copolymerisat aus Hämin, Vinylimidazol, Acrylamid und Bisacrylcystammin wurde entwässert, pulverisiert und mit Mercaptoäthanol reduziert.

Das ESR-Spektrum zeigt folgende g-Werte:

$g_1 = 2.40_7$ $g_2 = 2.24_8$ $g_3 = 1.92_3$

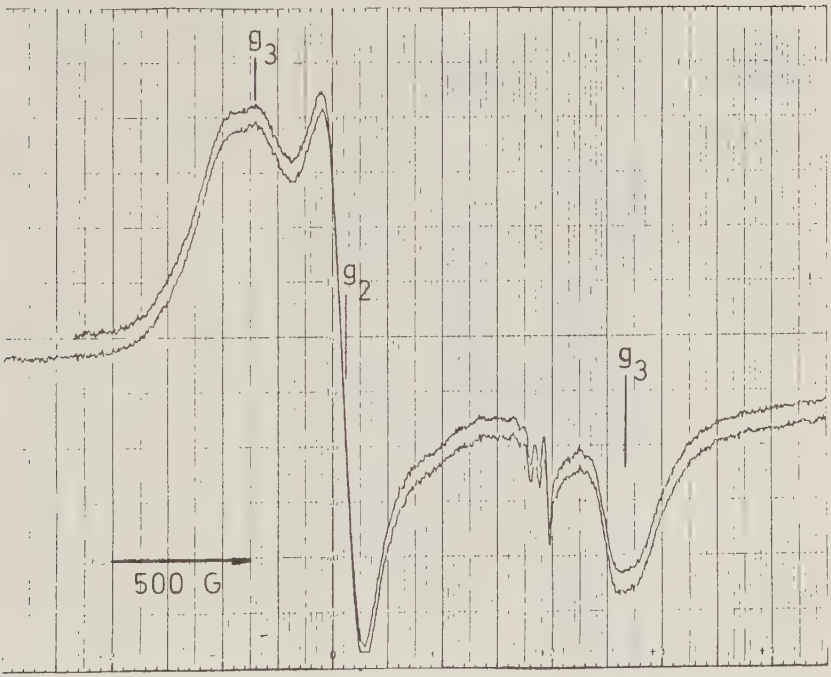


Abbildung 24:
ESR-Spektrum System III (reduziert)

Es liegt eine S-Fe-N-Koordination vor.

4.2.3.4. System IV: 1-Carboxyl-2-Imidazolylcarbonyl-Ethylen/Ethylen-Copolymer/Hämin

Von dem pulverisierten und gut getrockneten Häminkomplex des mit Imidazol umgesetzten Copolymers Ethylen/MAA wurde folgendes ESR-Spektrum erhalten:

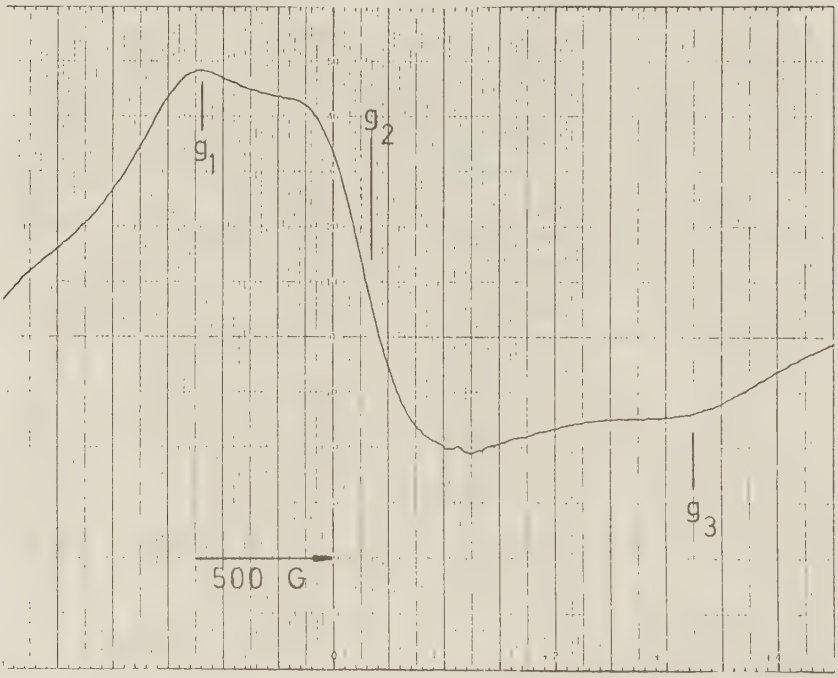


Abbildung 25:
ESR-Spektrum System IV

$g_1 = 2.74_7$ $g_2 = 2.21_4$ $g_3 = 1.60_7$

Auch hier ist aus der g-Wert-Aufspaltung ersichtlich, daß es sich um einen Bis-Imidazol-Komplex des Hämins handelt.

Beide Imidazolreste binden Hämin koordinativ an das unlösliche Polymer.
Zu diesem Pulver wurde Mercaptoäthanol gegeben und gut durchgerührt. Das Spektrum zeigt nun andere g-Werte:

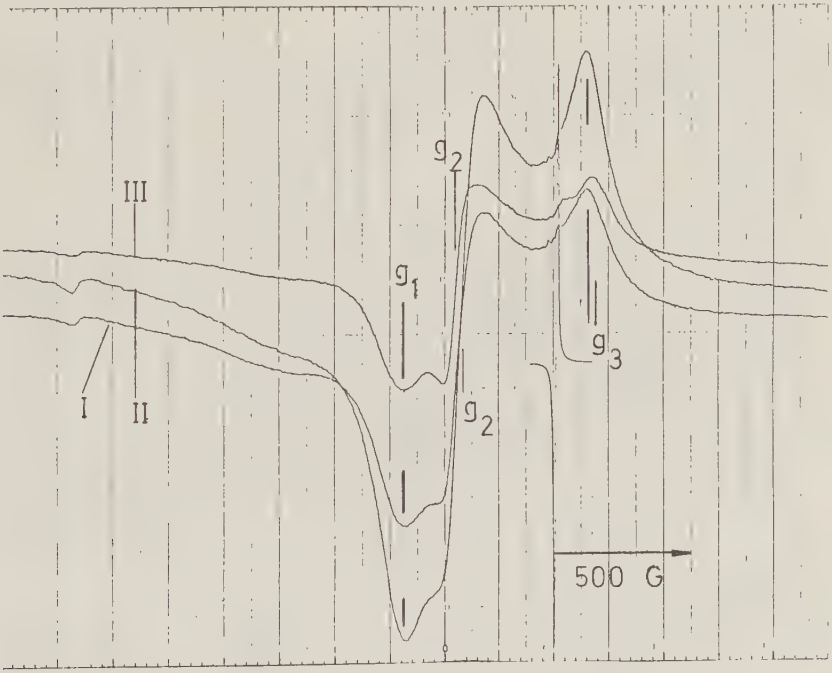


Abbildung 26:
ESR-Spektrum System IV + Met + Anilin

$g_1 = 2.39_6$ $g_2 = 2.23_9$ $g_3 = 1.94$
Auch hier ist ein Imidazolrest von dem Schwefelliganden verdrängt worden (Kurve I und II).
Zusätzlich wurde Anilin zum System hinzugegeben:

Im Spektrum III ist der g_3-Wert von $g_3 = 1.94$ nach $g_3 = 1.93_4$ und der g_2-Wert von $g_2 = 2.23_9$ nach $g_2 = 2.24_6$ verschoben worden. Diese Verschiebung ist ähnlich wie beim Enzym selbst.

4.2.3.5. System V: Keratin/Hämin

Eine wässrige reduzierte Keratinlösung wurde mit Hämin versetzt. Aus dem ESR-Spektrum ist ersichtlich, daß zwei Cysteinreste die beiden freien Koordinationsstellen am Hämin besetzten:

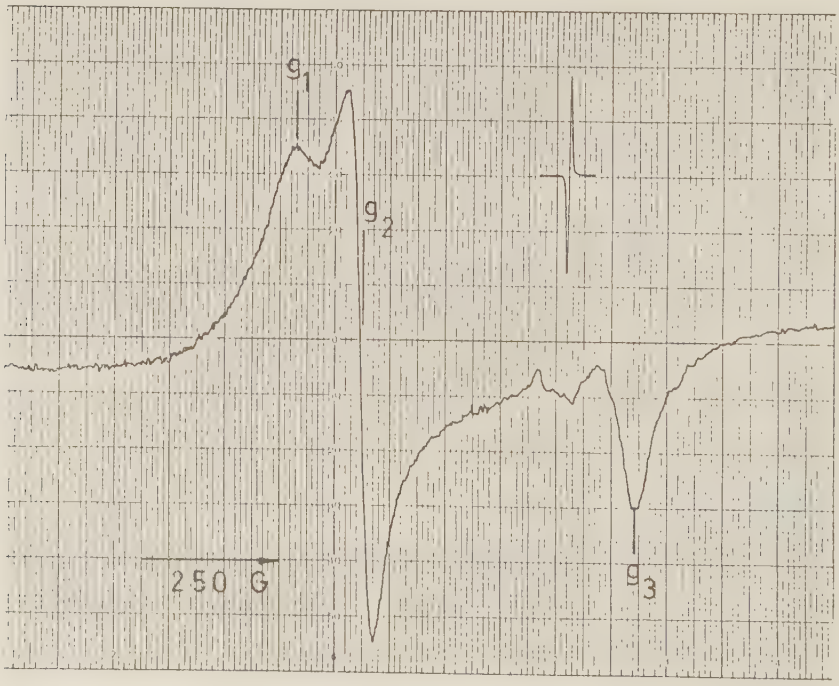


Abbildung 27:
ESR-Spektrum System V

Die g-Werte-Aufspaltung beträgt $g_1 = 2.33_7$ $g_2 = 2.24_9$ $g_3 = 1.93_3$. Es liegt eine S-Fe-S-Koordination vor.

4.2.3.6. Polyacrylcystein/Hämin

Zu einer wässrigen Lösung von Polyacrylcystein wurde Hämin gegeben. Aus der Aufspaltung der g-werte in $g_1 = 2.30_5$ $g_2 = 2.22_4$ und $g_3 = 1.94_1$ geht hervor, daß zwei Cysteinreste am Hämin koordinieren. Es liegt eine S-Fe-S-Koordination vor.

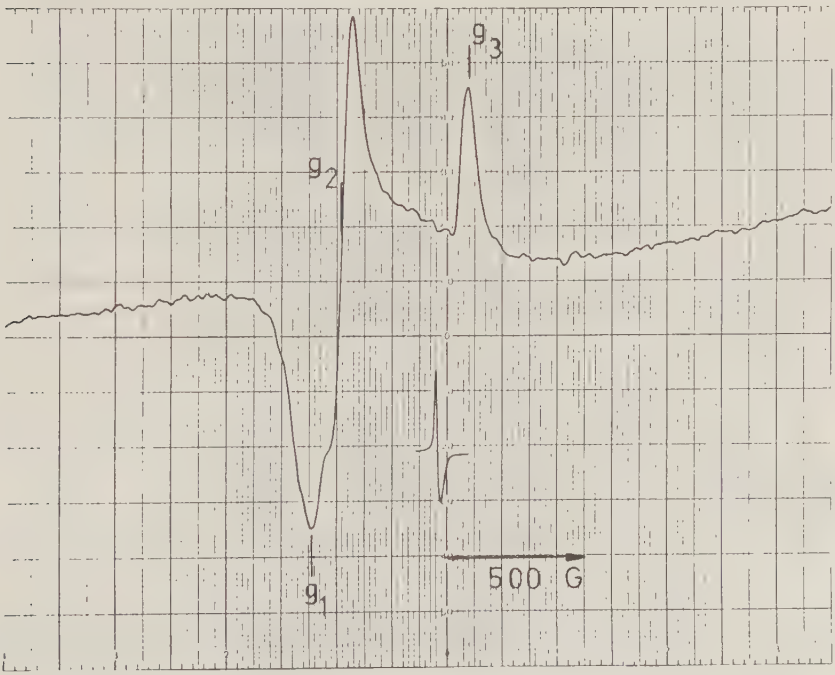


Abbildung 28:
ESR-Spektrum Polyacrylcystein/Hämin

Tabelle 2: g-Werte der polymeren Häminkomplexe

System	g_1	g_2	g_3	Ligandierung
I	2.81	2.25	1.56_9	N-Fe-N
I + Met	2.34	2.21_5	1.93	N-Fe-S
II	2.80	2.26_2	*	N-Fe-N
II + Met	2.42_2	2.24_4	1.91_9	N-Fe-S
III + Met	2.40_7	2.24_8	1.92_3	N-Fe-S
IV	2.74_7	2.21_4	1.60_7	N-Fe-N
IV + Met	2.39_6	2.23_9	1.94	N-Fe-S
IV + Met + Anilin	2.39_6	2.24_6	1.93_4	N-Fe-S
V	2.33_7	2.24_9	1.93_3	S-Fe-S
PAC/Hämin	2.30_5	2.22_4	1.94_1	S-Fe-S
P_{450} aus Rattenleber	2.42	2.26	1.92	N-Fe-S
Hämin/Imi/ Met in DMF	2.37_5	2.24_5	1.93_2	N-Fe-S
Hämin/Met in DMF	2.32_8	2.23_3	1.95_4	S-Fe-S

* nicht nachweisbar

Tabelle 2 zeigt, daß die g-Werte der polymern Häminkomplexe mit N-Fe-S-Koordination gut mit den g-Werten des Enzyms übereinstimmen.

5. Substratumsätze

Mit den in Kapitel 3. beschriebenen Modellsystemen für Cytochrom P_{450} wurden verschiedene Substrate umgesetzt. Die Auswahl der Substrate richtete sich nach folgenden Gesichtspunkten:

1. Es wurden Substrate verwendet, die auch vom Enzym selbst hydroxyliert wurden, um zu sehen, ob die Produktverteilung ähnlich wie bei Cytochrom P_{450} ist. Über die Produktverteilung kann man Rückschlüsse auf mechanistische Abläufe ziehen.
2. Andererseits wurden Substrate eingesetzt, die biologisch schwer abbaubar sind, bzw. Modellsubstanzen für derartige Umweltschadstoffe darstellen. Es sollte geprüft werden, ob sich die Enzymmodelle für den Abbau solcher Substanzen eignen.
3. Schließlich sollte untersucht werden, ob man mit diesen Enzymmodellen Hydroxyprodukte synthetisieren kann, welche auf "normalen" chemischen Wegen nur schwierig zu erhalten sind.

Der Einsatz verschiedener Modellsysteme sollte zeigen, mit welchen Mitteln sich die Reaktionsgeschwindigkeit der Hydroxylierungen steigern läßt. Außerdem war von Interesse, ob man durch Variation der Modellsysteme die Selektivität der Reaktionen beeinflussen kann.
Um Aufschluß über den zeitlichen Verlauf der Hydroxylierungen zu bekommen, wurden mit einigen Substraten und Modellsystemen kinetische Messungen durchgeführt.
Die Umsetzungen der Substrate zu ihren Metaboliten wurde mit Dünnschicht-, Hochdruckflüssigkeits- und Gaschromatographie untersucht.

Folgende Substrate wurden eingesetzt:
Anilin (Vergleich zum Enzym, Verhältnis ortho- zu para-Aminophenol, Benzidine als Umweltproblem)
Phenylessigsäure (aromatische Carbonsäuren sind teilweise biologisch schwer abbaubar).

Steroide:
Progesteron, Testosteron, Östradiol (Vergleich zum Enzym, komplizierte Synthesen)
Dopamin (wichtige Metaboliten)
Tryptophan (komplizierte Synthesen).

5.1. Hydroxylierungen mit System IV (1-Carboxyl-2-Imidzolyl-Carbonyl-Ethylen/ Ethylen-Copolymer/Hämin)

5.1.1. Anilin als Substrat

Zu einer Suspension von System IV in Wasser wurde Anilin gegeben. Thioglykolsäure wurde als sechster Ligand und Reduktionsmittel hinzugefügt. Der pH-Wert der Lösung betrug 6.1. Dieses Reaktionsgemisch wurde bei 25 ° C an Luft gerührt. Nach bestimmten Zeitabständen wurden Proben entnommen. Das unlösliche Polymer wurde abzentrifugiert und die Reaktionslösung direkt mit HPLC analysiert (s. Abb. 29). Das System ist in der Lage, Anilin mit einer sehr hohen Reaktionsgeschwindigkeit zu para- und ortho-Aminophenol im Verhältnis von etwa 7:1 zu hydroxylieren. Das entspricht ungefähr den Verhältnissen im Enzym, wo je nach Tierart para- zu ortho-Aminophenol Verhältnisse von 16:1 bis 1:1 auftreten. Das System Hämin/Mercaptoäthanol/Imidazol (51, 53) liefert ein Verhältnis von 17:1. Im Vergleich zu diesem System und dem Udenfriend-System (40) läuft die Reaktion ungefähr 20 mal schneller ab. Die turn-over Zeit beträgt ungefähr 40 min. Bei P_{450} selbst dauert ein Zyklus der Anilinhydroxylierung 3 sec. (66). Das ist zwar wesentlich schneller als im Modellsystem, doch lassen sich die Umsatzraten des Modellsystems vermutlich noch durch verschiedene Faktoren wie höhere Temperatur, optimaler pH-Wert und funktionelle Gruppen an den Liganden steigern.

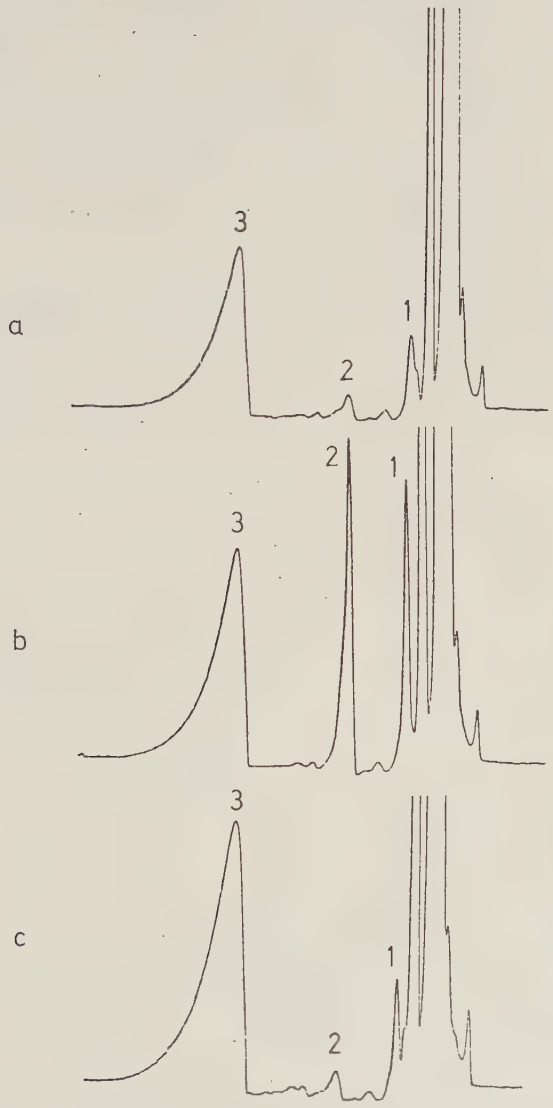
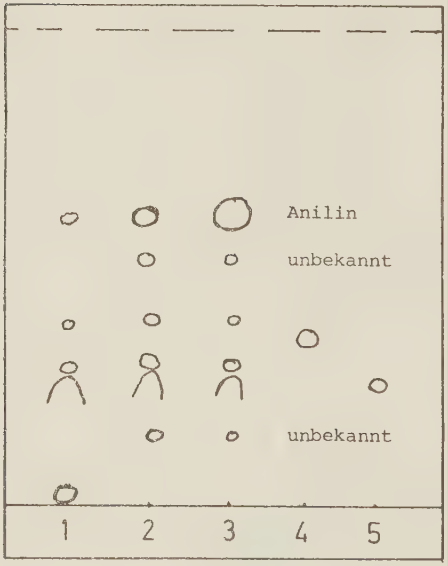


Abbildung 29: HPLC-Trennung des Anilin-Reaktionsansatzes:
1 para-Aminophenol 2 ortho-Aminophenol 3 Anilin
a) nach 3,5 h Reaktionszeit; b) Zugabe von para- und ortho-Aminophenol Eichlösung; c) nach 2,25 h Reaktionszeit.
Säule: Kationenaustauscher; Eluiermittel: Phosphatpuffer pH 2,9

Bedenkt man, daß dieses Modellsystem sehr billig und in großen Mengen herstellbar ist, so erscheint es sinnvoll, derartige Modelle zu synthetisieren. Diese sind außerdem viel unempfindlicher als biologische Systeme, und könnten eventuell als Katalysatoren für Reaktionen eingesetzt werden. Dabei könnte man sie leicht durch Zentrifugieren oder Filtrieren abtrennen. Ähnliche Vorstellungen kommen auch bei Wulff zum Ausdruck (67).

In einem weiteren Versuch wurde anstelle von Thioglykolsäure Mercaptoäthanol als sechster Ligand und Reduktionsmittel eingesetzt. Nach 6, 27 und 53 Stunden wurden Proben des Reaktionsansatzes mit DC analysiert. Es entstanden ebenfalls die Produkte para- und ortho-Aminophenol.



Front

Abbildung 30:

1) Reaktionsansatz nach 53 h
2) Reaktionsansatz nach 27 h
3) Reaktionsansatz nach 6 h
4) ortho-Aminophenol
5) para-Aminophenol

Laufmittel: A

Start

Die Umsatzraten sind niedriger als mit Thioglykolsäure. Nach 53 Stunden ist nur noch sehr wenig Anilin im Reaktionsansatz vorhanden. Das bedeutet, daß die turn-over-Zeit

ungefähr bei 2,5 Stunden liegt. Das Verältnis von para- zu ortho-Aminophenol liegt in der gleichen Größenordnung wie im vorhergegangenen Versuch.

5.1.2. Phenylessigsäure als Subtrat

Als weiteres Substrat wurde Phenylessigsäure eingesetzt. In diesem Fall wurde Cystein als sechster Ligand und Reduktionsmittel verwendet, da das entstehende Cystin ausfällt und leicht abgetrennt werden kann. Die Reaktionsbedingungen waren gleich wie bei Anilin. Zur Aufarbeitung wurde die Lösung angesäuert, mit Ether extrahiert und mit DC analysiert.

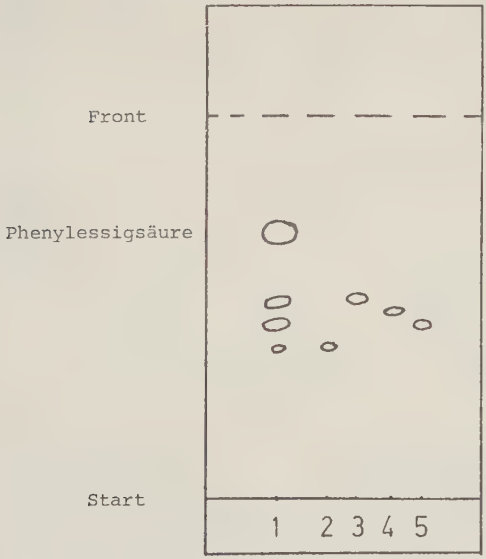


Abbildung 31:
1) Reaktionsansatz
2) Mandelsäure
3) ortho-
4) para-
5) meta-Hydroxyphenylessigsäure

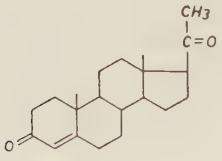
Laufmittel: C

Es bildete sich hauptsächlich ortho- und meta-Hydroxyphenylessigsäure, etwa im Verhältnis 1:1. Mandelsäure trat nur in geringen Mengen auf. Die turn-over-Zeit, bezogen auf alle Produkte, lag ungefähr bei 2,5 Stunden.

5.1.3. Steroide (Progesteron, Testosteron und Östradiol) als Substrate

Die eingesetzten Steroide lösen sich praktisch nicht in Wasser. Deshalb wurde hier der Schwefelligand als Lösungsmittel für Substrate verwendet. Er erfüllte also drei verschiedene Funktionen: Sechster Ligand für das Eisenatom im Hämin, Reduktionsmittel und Lösungsmittel.
Die Reaktionen wurden wie folgt durchgeführt:
Der getrocknete und fein pulverisierte polmyere Hämin-Bisimidazol-Komplex wurde zu der Substratlösung hinzugefügt. Die Suspension wurde an Luft gerührt. Als Schwefelkomponenten wurden Mercaptoäthanol, Isopropyl- und Propylmercaptan verwendet. Sämtliche Steroide konnten hydroxyliert werden. Die Ausbeuten der Reaktionen, sowie die Spezifität waren unterschiedlich. Die größten Umsätze konnten mit Progesteron erzielt werden.

5.1.3.1. Progesteron als Substrat



Progesteron

Zu einer Lösung von Progesteron in Mercaptoäthanol wurde System IV zugegeben und das Gemisch an Luft gerührt.
Zur Aufarbeitung des Reaktionsansatzes wurde Wasser hinzugefügt und mit Essigsäureethylester mehrfach extrahiert. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in Chloroform aufgenommen und mit DC und HPLC analysiert:

Abbildung 32:
HPLC-Trennung der Progesteronderivate, Si 60, $CHCl_3$- H_2O-gesättigt
2.13 Progesteron
2.56-5.39 Hydroxylierungsprodukte
6.47 Met-Disulfid

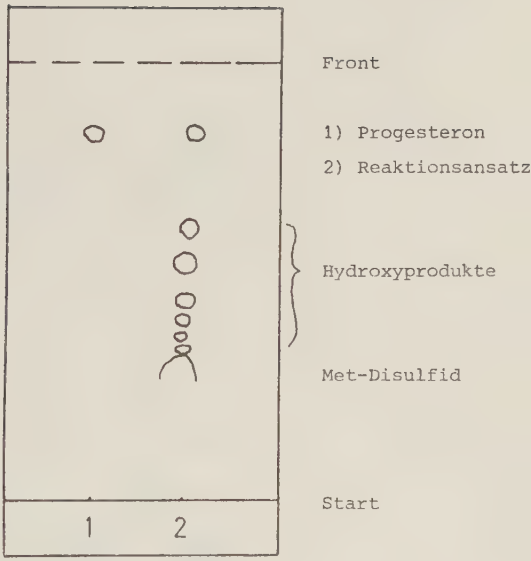


Abbildung 33:
DC-Trennung der Hydroxylierungsprodukte von Progesteron
Laufmittel D

Es zeigte sich, daß nach 70 Stunden etwa 40 % des eingesetzten Progesterons zu einer Reihe von Hydroxylierungsprodukten umgesetzt wurde. Die gesammelten Hydroxysteroidfraktionen mehrerer HPLC-Läufe wurden mit GC-MS untersucht, um zusätzliche Hinweise auf die Identität der Hydroxyprodukte zu erhalten:

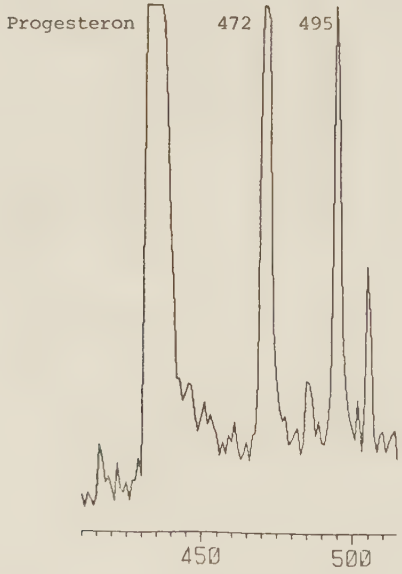
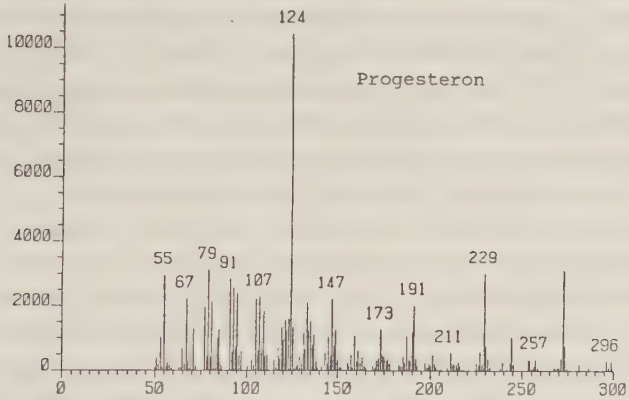
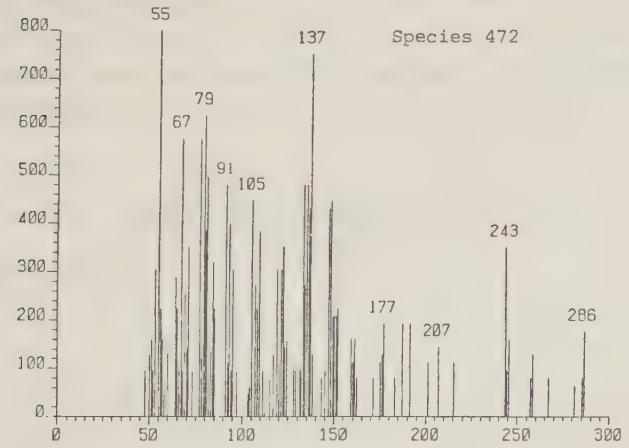
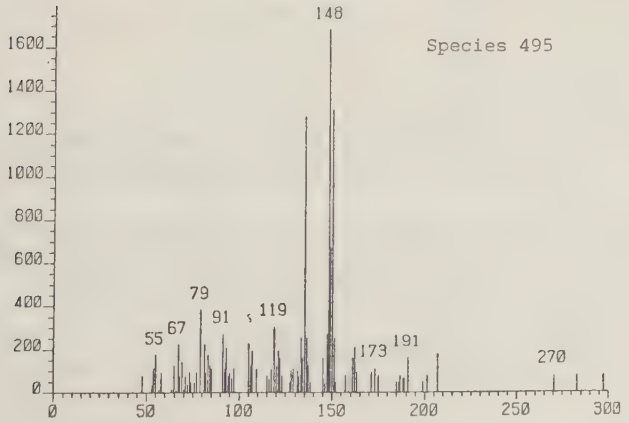


Abbildung 34: Trennung von Progesteron und seinen Hydroxylierungsprodukten.
Bedingungen: 20 m lange OV 101-Säule, Carlo Erba Fraktovap 2101

Abbildung 35: Massenspektren von Progesteron, Species 472 und 495*



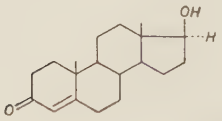




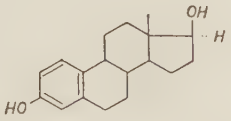
* Von Species 472 und 495 wurden keine Molekülionen gefunden.

Für die 4-En-3-Ketosteroide, also auch Progesteron, ist das Auftreten eines Fragments der Masse 124 außerordentlich typisch. Es enthält den A-Ring und die C-Atome 6 und 19, sowie 2 Wasserstoffe aus dem Restteil des Moleküls. Da die Massenspektren der beiden Species 472 und 495 dieses Schlüsselbruchstück nicht enthalten, könnte die OH-Gruppe an den C-Atomen 1, 2, 6, 11, 17, 19 sitzen (68). Das bei der Species 472 auftretende Bruchstück der Masse 137 deutet nach (69) zusätzlich auf eine Hydroxylierung an C-6 hin. Bei der Hydroxylierung von Progesteron mit System IV entstanden also mehrere isomere Progesteronderivate. Die verschiedenen Hinweise (R_f-Werte, Farbreaktionen, Massenspektren) lassen vermuten, daß 2α-, 11α-, 11ß- und 16α-Hydroxyprogesteron gebildet wurde. Die eindeutige Identifizierung der Produkte ist schwierig. Vor allem müßten alle denkbaren Vergleichssubstanzen zur Verfügung stehen, was im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war.

5.1.3.2. Testosteron und Östradiol als Substrate



Testosteron



Östradiol

Testosteron und Östradiol wurden jeweils in Mercaptoäthanol gelöst. Nach Zugabe von System IV-Pulver wurde an Luft gerührt. Die Ansätze wurden nach 1, 2 und 4 Tagen mit DC untersucht.
Die Farbreaktionen mit dem Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz und die R_f-Werte ($SiO_2/CHCl_3$-EtOH 9:1) lassen folgende Hydroxyprodukte vermuten:
Testosteron: 4-OH, 11ß-OH, Androstendion, 14α-A.
Östradiol: 2-OH, 11α-OH, 16ß-OH.

Bei Ansätzen mit Propylmercaptan und Isopropylmercaptan zeigten sich nur geringe Umsätze.
Das System IV ist also auch in der Lage, aliphatische Verbindungen - wie verschiedene Steroide - zu hydroxylieren. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist, wie beim Enzym selbst, geringer als mit Anilin und Phenylessigsäure. Die turnover-Zeiten liegen um 9 Stunden (Progesteron), 20 Stunden (Östradiol) und 30 Stunden (Testosteron). Doch bei diesen Substraten ist die Verbesserung der Stereospezifität der Reaktionen viel interessanter. Dadurch kann man eventuell gezielte Synthesen von Hydroxysteroiden durchführen. Diese sind oft nur über enzymatische Synthesen in geringen Mengen erhältlich.
Die Ergebnisse der Umsetzungen mit System IV im Vergleich zu den von Cytochrom P_{450} katalysierten Reaktionen zeigt Tabelle 3:

Steroid	P_{450}	System IV	Literatur
Progesteron	2α-OH, 15α-OH 6β-OH, 15β-OH 7α-OH, 16α-OH	2α-OH 11α-OH, 11ß-OH 16α-OH	(70,71)
Testosteron	6β-OH, 7α-OH 16α-OH	4-OH, 11ß-OH Androstendion 14α-A	(71,72,73)
Östradiol	6α-OH, 6β-OH 16α-OH	2-OH 11α-OH, 16ß-OH	(71)

5.1.4. Dopamin als Substrat

Dopaminhydrochlorid wurde zu einer wässrigen Suspension von System IV zugegeben. Als Schwefelligand wurde Thioglykolsäure verwendet. Der pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt. Nach 16, 68 und 138 Stunden wurde das Reaktionsgemisch mit DC untersucht.

Es sind drei Dopaminfolgeprodukte entstanden. Eine der drei Substanzen stimmt sowohl im R_f-Wert (O), als auch in der Farbreaktion mit den drei Sprühreagenzien Ethylendiamin, Dichlorchinonchlorimid und Ninhydrin mit 6-OH-Dopamin überein. Diese Substanz ist neurochemisch aktiv. Nach 138 Stunden enthält der Reaktionsansatz kein Dopamin mehr. Daraus errechnet sich eine turn-over-Zeit von 2,7 Stunden.

Mit dem Komplex aus Hämin und 1-Carboxy-2-Imidazolylcarbonyl-Ethylen/Ethylen-Copolymer, sowie verschiedenen Schwefelliganden wie Mercaptoäthanol, Thioglykolsäure und Cystein können also Hydroylierungsreaktionen mit verschiedenen Substraten katalysiert werden. Die Reaktionsgeschwindigkeiten, sowie die Stereospezifität hängen unter anderem auch von den verwendeten Schwefelliganden ab. Durch den Einsatz des richtigen Schwefelliganden kann man die Hydroxylierungen vielleicht in die gewünschte Richtung lenken und die Umsatzraten steigern.

5.2. Hydroxylierungen mit dem System V (Keratin/Hämin)

5.2.1. Phenylessigsäure als Substrat

Zu einer wässrigen Lösung von reduziertem Keratin und Hämin wurde Thioglykolsäure gegeben und der pH-Wert auf 7 eingestellt. Phenylessigsäure wurde als Substrat hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde an Luft gerührt. Nach bestimmten Zeitabständen wurden Proben aus der Lösung entnommen, angesäuert und mit Ether extrahiert. Die Etherextrakte wurden mit DC und GC untersucht:

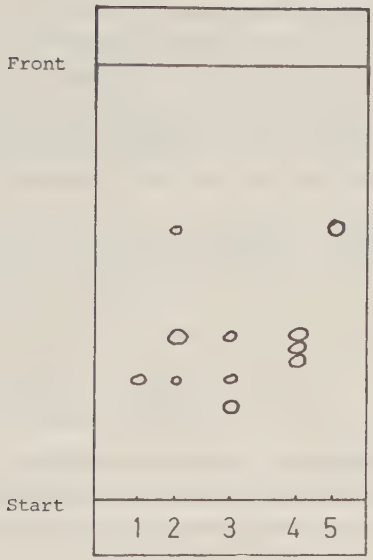


Abbildung 36:

1) Mandelsäure
2) Reaktionsansatz nach 27 h
3) Reaktionsansatz nach 70 h
4) ortho-, para-, meta-Hydroxyphenylessigsäure
5) Phenylessigsäure

Laufmittel: C

Auch dieses System ist in der Lage, die Hydroxylierungsreaktionen sehr gut zu katalysieren. Die Reaktionsprodukte sind ortho-Hydroxyphenylessigäsure, Mandelsäure sowie vermutlich ortho-Hydroxymandelsäure. Die turn-over-Zeit für die gesamte Reaktion (alle Produkte) beträgt ungefähr 2,4 Stunden. Das ist fast gleich, wie bei System IV mit Cystein und liegt in der Größenordnung der Anilinhydroxylierung mit System IV und Mercaptoäthanol.
Im Vergleich zum niedermolekularen System Cys/Hämin/Imi wurde die Reaktionsgeschwindigkeit jedoch um das 30-fache gesteigert.
Die gebildete Mandelsäure wurde mit der gaschromatographischen Enantiomerenanalyse auf ihre Enantiomerenreinheit untersucht (siehe Kap. 6.).

5.2.2. Tryptophan als Substrat

Cytochrom P_{450} setzt Tryptamin und verschiedene andere Indolderivate zu einer Reihe von Hydroxyprodukten um (74, 75). Auch das Udenfriend-System (40,76) und das Fenton-System (39, 77, 78) können verschiedene Inodlderivate hydroxylieren. Deswegen wurde nun hier versucht, die Aminosäure Tryptophan, die ja auch einen Indolrest enthält, als Substrat zu hydroxylieren. 5-OH Hydroxytryptophan wäre ein interessanter Metabolit, der als Vorstufe von Serotonin therapeutisch eingesetzt wird.
Zu einer wässrigen Lösung von System V wurde Tryptophan zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde an Luft gerührt und mit DC untersucht. Im Gegensatz zu dem niedermolekularen System Hämin/Mercaptoäthanol in Wasser/Aceton (53), bei dem mit Tryptophan keine Hydroxylierungsprodukte gefunden wurden, ist in diesem Versuch das Substrat hydroxyliert worden.

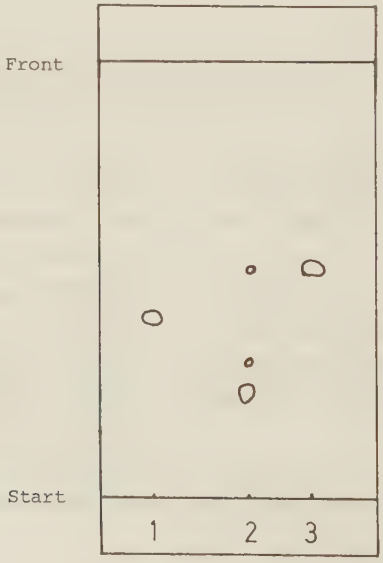


Abbildung 37:

1) 5-OH L-Tryptophan
2) Reaktionsansatz nach 24 h
3) L-Tryptophan

Laufmittel: B

Die Substanz wurde nicht eindeutig identifiziert, doch zeigt die Farbreaktion mit dem van Urks Reagenz (79), daß es sich um ein Indolderivat handelt. Hier wird also deutlich, daß der polymere Ligand einen sehr starken Einfluß auf das Gelingen der Hydroxylierung haben kann. Man kann hier von einem Polymereffekt sprechen.

5.3. Hydroxylierungen mit System II (Acrylamid/Vinylimidazol-Copolymer + Hämin) und mit System IIa (Acrylamid/Vinylimidazol/Hämin-Copolymer)

5.3.1. Anilin als Substrat

Zu einer wässrigen Lösung von System II wurde Mercaptoäthanol gegeben. Das Substrat Anilin wurde zu para- und ortho-Aminophenol umgesetzt. Die Ausbeuten sind jedoch geringer, als mit System IV. Mit dem modifizierten System II^a, bei dem Hämin mit Acrylamid und Vinylimidazol copolymerisiert wurde, erhält man dagegen sehr gute Ausbeuten.

Anilin wurde in Mercaptoäthanol gelöst und rotes, unlösliches System IIa-Pulver zugegeben. Das Mercaptan hat hier ebenfalls drei Funktionen (Lösungsmittel für das Substrat, sechster Ligand und Reduktionsmittel). Der Reaktionsansatz wurde an Luft gerührt. Auch hier wurde Anilin zu para- und ortho-Aminophenol umgesetzt.
Die turn-over-Zeit der Reaktion beträgt ungefähr 100 min. Durch die sehr hohe Substratkonzentration (3-molar) wird die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht.

5.4. Hydroxylierungen mit System III

5.4.1. Anilin als Substrat

Gelartiges System III wurde in Wasser aufgeschlämmt und Anilin als Substrat zugegeben. Das Gel konnte mit Natriumdithionit gelöst werden. Dabei wurden die quervernetzten

Disulfidbrücken zu freien SH-Gruppen reduziert:

$$R\text{-}S\text{-}S\text{-}R \xrightarrow[+2H^+]{+2e^-} 2\ R\text{-}SH$$

Nach 9 Stunden waren bereits para- und ortho-Aminophenol nachweisbar. Nach 50 Stunden wurde der Reaktionsansatz aufgearbeitet und untersucht.

Auf der DC-Platte sieht man sehr starke Flecken von para- und ortho-Aminophenol. Die turn-over-Zeit liegt ungefähr bei 3 Stunden. Das para- zu ortho-Aminophenolverhältnis beträgt etwa 1:1.
An diesem Versuch sieht man, daß auch andere Reduktionsmittel, wie z.B. Natriumdithionit für die Reaktion verwendet werden können. Das "Festbinden" der Liganden am Polymer bewirkt auch in diesem Fall eine starke Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich zu den niedermolekularen Systemen. Außerdem kann dieses System - wie in Kap. 3 beschrieben wurde - sehr einfach durch Ultrafiltration von der Reaktionslösung entfernt werden. Eventuell lassen sich derartige Systeme für den Abbau biologisch schwer abbaubarer Substanzen im Abwasser verwenden. Das umweltschädliche Benzidin, das ja dem Anilin sehr verwandt ist, konnte bereits mit niedermolekularen Systemen hydroxyliert werden (80).

5.5. Hydroxylierungen mit System VI (Polyvinylalkohol-Cystein-Histidin-Ester/Hämin)

Mit einem ähnlichen System wie im vorhergehenden Abschnitt wurde ebenfalls Anilin umgesetzt. System VI wurde in Wasser suspendiert und Anilin zugegeben. Wiederum wurde Natriumdithionit als Reduktionsmittel eingesetzt und der pH-Wert auf 6.5 eingestellt. Der Reaktionsansatz wurde mit DC untersucht. Anilin wurde, allerdings mit geringen Ausbeuten, zu para- und ortho-Aminophenol umgesetzt. Der Vorteil die-

ses Systems ist, daß man den Häminkomplex leicht abfiltrieren kann. Doch lohnt es sich kaum, dieses System weiter zu untersuchen, da die Ausbeuten zu gering sind.

5.6. Hydroxylierungen mit Natriumperjodat

In Anwesenheit von Jodosobenzol können Lebermikrosomen die O-Desalkylierung von 7-Äthoxycumarin katalysieren (33). Die Reaktion erfolgt in Abwesenheit von NADPH und O_2. In diesem Fall verhält sich Cytochrom P_{450} als Oxen-Transferase. Das Sauerstoffatom, welches mit der Fe^{3+}-Form des Enzyms die oxenoide Spezies bildet, kann also auch von Oxen-Donatoren geliefert werden (71). Man findet einen Peak bei 440 nm im Differenzspektrum. Durch Zugabe verschiedener Oxen-Donatoren zum Enzym konnte eine Reihe von Substraten hydroxyliert werden:

Tabelle 4:

Oxen-Donator	Substrat	Metabolit	Lit.
Cumolhydroperoxid	Äthanol	Acetaldehyd	(81)
H_2O_2	Anilin	Aminophenole	(82)
$NaJO_4$, $NaClO_2$ org. Hydroperoxide	Steroide	verschiedene Hydroxysteroide	(71)
Jodosbenzol	Äthoxycumarin	Cumarin	(33)

Es lag daher nahe, auch zu einem der hier synthetisierten polymeren Häminkomplexe Oxen-Donatoren zuzugeben. Es sollte geprüft werden, ob auch auf diese Weise Substrate hydroxyliert werden können. Folgender Versuch wurde mit $NaJO_4$ als Oxen-Donator gemacht:

5.6.1. System IV Substrat Anilin
(1-Carboxy-2-Imidzaolylcarbonyl-Ethylen/
Ethylen-Copolymer/Hämin)

Zu einer wässrigen Suspension von System IV wurde Anilin gegeben. Nach der Zugabe einer $NaJO_4$-Lösung wurde der Reaktionsansatz an Luft gerührt und nach 18 Stunden mit DC untersucht. Obwohl bei diesem System keine SH-Gruppen anwesend sind, trat neben Anilin ein sehr starker Fleck von ortho-Aminophenol auf. Nach 44 Stunden war kein Anilin mehr nachweisbar. Aus dem Verhältnis von Substrat zu Fe^{3+} berechnet sich eine turn-over-Zeit von ungefähr 90 min. Die Reaktion mit $NaJO_4$ läuft also etwa halb so schnell ab, wie mit O_2 und Thioglykolsäure.
In letzter Zeit wurde von verschiedenen Autoren über Reaktionen mit Oxen-Donatoren berichtet, die von Übergangsmetallkomplexen katalysiert wurden. Mohr et al. (82) setzten ebenfalls Anilin als Substrat ein. H_2O_2 wurde als Oxen-Donator verwendet. Als Katalysator diente dabei ein polymerer Bisimidazolkomplex von Hämin. Die Reaktion verläuft mit sehr hoher Geschwindigkeit. Die turn-over-Zeit beträgt ungefähr 4 min bei 800-fachem Überschuß an Substrat und H_2O_2.
Groves et al. (83) konnten mit Jodosobenzol und verschiedenen Metallporphyrinen als Katalysatoren Olefine zu Epoxiden und Alkane zu Alkoholen hydroxylieren.
Mansuy und seine Mitarbeiter (84) setzten organische Peroxide als Sauerstoffdonatoren ein. Cyclohexan konnte ebenfalls mit verschiedenen Metalloporphyrinen zu Cyclohexanol und Cyclohexanon umgesetzt werden.
Diese Beispielezeigen, daß die Eigenschaften von P_{450} als Oxentransferase mit Modellsystemen bereits gut reproduziert werden können.
Durch Variationen am Porphyrinsystem, des Metalls, der Liganden am Zentralatom und der Oxen-Donatoren hat man auch hier vielfältige Möglichkeiten, die Oxygenierungsreaktionen

zu steuern. Durch Verwendung von Oxen-Donatoren, die in großen Mengen relativ günstig zur Verfügung stehen (z.B. H_2O_2 oder $NaClO_2$) sowie geeigneter Metalloporphyrine (z.B. Phtalocyanine), kann man eventuell Systeme entwickeln, die in der Abwasserreinigung auch zu einer praktischen Anwendung kommen könnten.

6. Asymmetrische Hydroxylierungen

Als besonderes Kriterium für die Modellsysteme wurde ihre Befähigung zur asymmetrischen Hydroxylierung untersucht. Es ist bekannt, daß Monooxygenasen prochirale Methylengruppen mit hoher Selektivität und unter Retention hydroxylieren können (85).
Als Substrat für die Modellsysteme wurde Phenylessigsäure ausgewählt. Diese enthält eine prochirale CH_2-Gruppe und kann unter anderem zu Mandelsäure hydroxyliert werden.
Die Hydroxylierungsprodukte wurden mit $LiAlH_4$ zu den entsprechenden Phenylethylalkoholen reduziert, mit Perfluorpropionsäureanhydrid verestert und gaschromatographisch mit Chirasil-Val (86) untersucht (87).
Diese Methode ermöglicht eine direkte Enantiomerenanalyse mit sehr geringen Mengen der ungereinigten Substanz. Darüber hinaus können auch weitere Hydroxylierungsprodukte bestimmt werden.
Das Ziel dieser Experimente war es, zu prüfen, ob auch synthetische Enzymmodelle zur asymmetrischen Hydroxylierung befähigt sind.
Andererseits sollten Variationen optisch aktiver Liganden am Hämin genauere Aufschlüsse über den Reaktionsablauf am Aktivzentrum der Modellsysteme bringen. Die Chrialität wird hierbei als Sonde zur Klärung biochemischer Mechanismen benützt, um neue Aussagen über den Übergangszustand zu gewinnen.

Für die Durchführung der gaschromatographischen Untersuchungen danke ich Herrn Dr. B. Koppenhöfer.

6.1. Niedermolekulare Modellsysteme

Folgende Liganden wurden mit Hämin zu Modellsystemen umgesetzt:
L-Cys/L-His; L-Cys/Imi; Met/His
Durch die Kombination von optisch aktiven mit inaktiven Liganden sollte geklärt werden, welche Liganden am Übergangszustand der Enzymmodell-Reaktion beteiligt sind. Dabei waren folgende Fragen zu klären:

1) Wird Phenylessigsäure zu Mandelsäure hydroxyliert?
2) Tritt eine Enantiomerenanreicherung ein?
3) Sind die Enantiomerenanreicherungen bei allen drei Systemen gleich oder treten charakteristische Unterschiede auf?

Von besonderem Interesse war die Hypothese, daß der Schwefelligand während der Hydroxylierungsreaktion am Eisenatom verbleibt und der Stickstoffligand durch das Substrat verdrängt wird, in Übereinstimmung mit dem von Ullrich formulierten Oxenoid-Mechanismus (33).

Ergebnisse:

Das Substrat Phenylessigsäure wird von allen drei Systemen zu verschiedenen Produkten hydroxyliert.

Tabelle 5:

Systeme	Gesamt-Umsatz* %	Monohydroxyprodukte **	Ringhydroxylierung***			Mandelsäure	% R	% S
			o-	p-	m-			
Cys/His	6	19	35	52	13	10	49,7	50,3
Cys/Imi	4	48	22	63	15	8	50,1	49,9
Met/His	5	6	21	50	29	2	50,2	49,8

* Bezogen auf das Substrat nach 80 h Reaktionszeit

** Rückgewinnungsrate an Phenolen über 80 %

*** Epoxide, Polyhydroxyprodukte und Folgeprodukte wurden nicht ausgewertet.

Alle drei Systeme liefern annähernd racemische Mandelsäure. Die Enantiomerenanreicherungen liegen hier in der Fehlergrenze der Auswertemethode.
Die Verhältnisse der einzelnen phenolischen Hydroxyverbindungen sind bei allen drei Systemen ähnlich.
Es fällt auf, daß bei Verwendung von Met anstelle von Cys die Bildung von Mandelsäure stark abnimmt. Das deutet darauf hin, daß der Schwefelligand einen Einfluß auf die Produktverteilung hat.
Da bei diesen Versuchen nur racemische Mandelsäure gebildet wurde, liegt folgende Erklärung nahe:
Eine meßbare Enantiomerenanreicherung tritt nur auf, wenn der am Übergangszustand beteiligte optisch aktive Ligand auf derselben Seite des Porphyrinringsystems sitzt, wie das Substrat. Da sich der Schwefelligand auf der abgewandten Seite des Hämringes befindet, ist der Stickstoffligand in diesen Modellsystemen anscheinend nicht am Übergangszustand direkt beteiligt, da mit L-Histidin ja keine optische Induktion auftritt.
Andererseits laufen enzymatische Monooxygenierungen mit großer Selektivität ab. Das kann aber nur bedeuten, daß das Protein, welches das Aktivzentrum umgibt, eine wichtige Rolle spielt, um das Substrat in die richtige Orientierung zu bringen.

6.2. Polymere Modellsysteme

6.2.1. Polyacrylcystein/Hämin

Um eine chirale Umgebung am Hämin zu schaffen, bei der die Liganden sich nicht zu weit vom Eisenatom wegbewegen können, wurde ein Polymer mit optisch aktiven Liganden synthetisiert. Es lag nahe, L-Cystein an ein Trägerpolymer zu binden. Untersuchungen mit ESR zeigten, daß beide Cysteinreste am Hämin koordinieren. Einer der beiden Liganden wird durch das Substrat verdrängt. Allerdings kann sich

dieser abdissozierte Cysteinrest nicht "beliebig" weit vom Eisenatom un dem daran befindlichen Substrat entfernen, da er an das Polymer gebunden ist. Es könnte also sein, daß sich die Chiralität des abdissozierten Liganden dem Substrat mitteilt und eine optische Induktion bewirkt.
Zur Überprüfung der Vermutungen wurde zu einer wässrigen Lösung des Komplexes aus Polyacrylcystein und Hämin Phenylessigsäure als Substrat gegeben. Nach gewissen Zeitabständen wurde jeweils eine Probe aus der Reaktionslösung entnommen. Sie wurde angesäuert und mit Ether extrahiert. Die Etherlösungen wurden mit $LiAlH_4$ reduziert.
Die Ausbeute an Mandelsäure war zu gering, um eine signifikante optische Induktion nachweisen zu können.

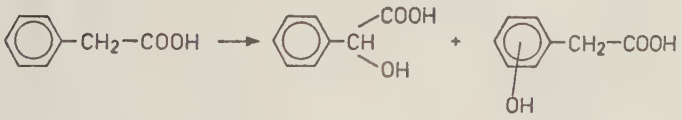
6.2.2. System V Keratin/Hämin

Eine wichtige Voraussetzung für die Synthese von Enzymmodellen, welche asymmetrische Synthesen katalysieren können, ist offenbar die Konstruktion von chiralen Hohlräumen, in denen die Substrate in einer bestimmten Orientierung fixiert sind (67). Das zeigen auch die bisherigen Versuche.
Durch die Verwendung des natürlichen Proteins Keratin als chiralem Ligand für Hämin könnte die Umgebung am Eisenatom so gestaltet werden, daß sich die chirale Information auf das Subtrat überträgt.
Aus dem ESR-Spektrum des Komplexes aus Keratin und Hämin ist ersichtlich, daß zwei Cysteinreste des Proteins als Ligand am Eisenatom koordinieren. Jedoch kann man daraus nicht bestimmen, ob die Koordination im "Innern" oder an der Peripherie des Proteinknäuels erfolgt. Für die asymmetrische Reaktion wäre es günstig, wenn das Hämin in einem chiralen Hohlraum des Proteins sitzen würde.
Das Substrat könnte dann nur eine bestimmte Orientierung zum katalytischen Zentrum einnehmen.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde zu der wässrigen reduzierten Keratinlösung Hämin zugegeben. Als Substrat wurde Phenylessigsäure zugefügt und die Lösung bei pH 7 an Luft gerührt. Als Reduktionsmittel wurde Thioglykolsäure verwendet. Nach bestimmten Zeitabständen wurden Proben entnommen und analysiert. Die Aufarbeitung erfolgte analog zu den niedermolekularen Systemen.

Ergebnis:
Die nach 27 Stunden entnommene Probe des Reaktionsansatzes enthält kaum noch das Ausgangsprodukt Phenylessigsäure. Das bedeutet, daß die Reaktionsgeschwindigkeit der Hydroxylierungsreaktion im Vergleich zu den niedermolekularen Modellsystemen stark zugenommen hat. Als Hauptprodukte sind ortho-Hydroxyphenylessigsäure und vermutlich ortho-Hydroxymandelsäure entstanden.
Mandelsäure tritt nur in geringen Mengen auf.

Reaktionsgleichung:



Nach der Reduktion der Hydroxlierungsprodukte zu den entsprechenden Alkoholen und Glykol, wurde letzteres mit DC angereichert ($SiO_2/CHCl_3$ und $SiO_2/CHCl_3$:Aceton 1:1).
Die PFP-Derivate des Glykols wurden an "Chirasil-Val" getrennt.

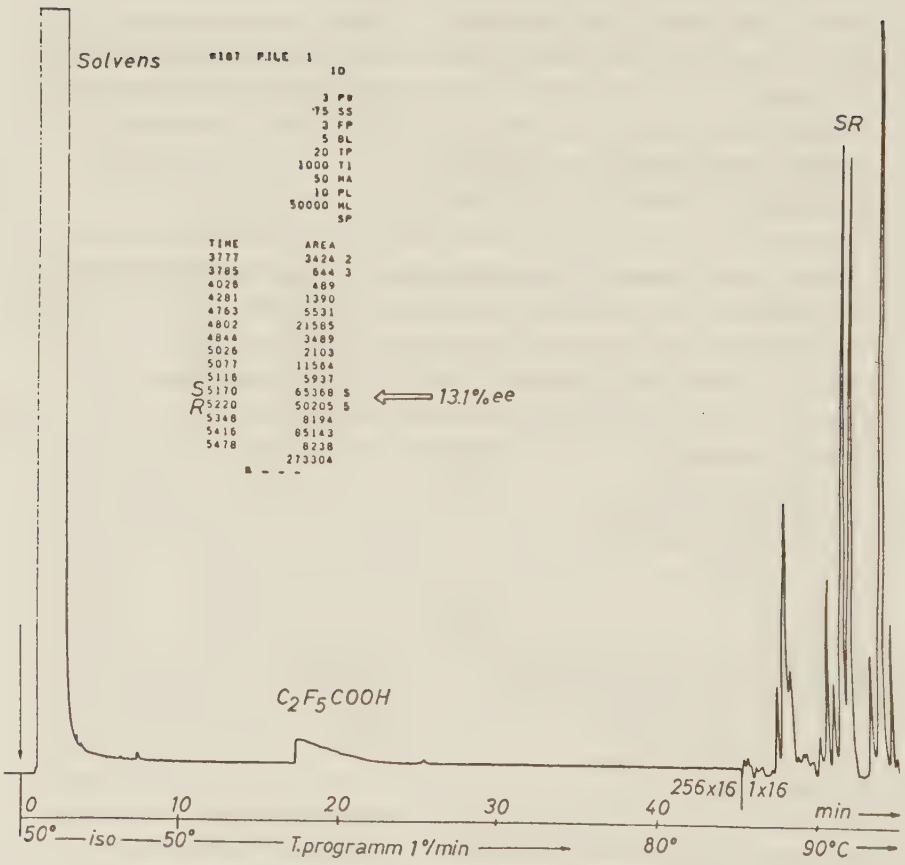
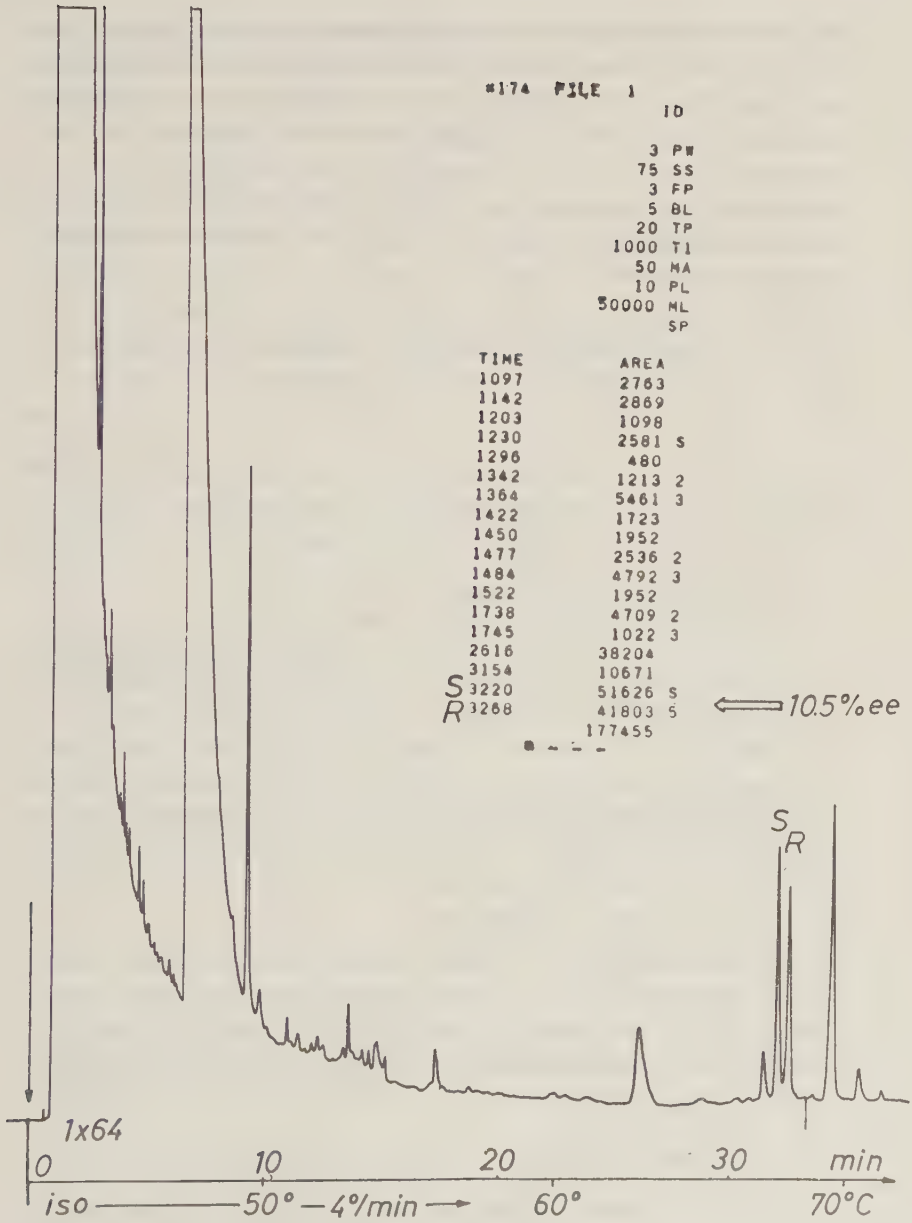


Abbildung 38:

Zur Enantiomerenausbeute der Oxidation von Phenylessigsäure mit System V, Glaskapillare (20m x 0.3mm) belegt mit "Chirasil-Val", 0,4 at H_2, FID, Integrator: Spectra Physics, System I

a) 1. Splitlose Einspritzung (1 µl) bei 50° C
   2. nach 1 min. Splitverhältnis 1:30, 50° C isotherm
   3. nach 10 min. Temperaturprogramm 1° C/min.



Abbbildung 38:

b) Einspritzung 1 µl der hoch konzentrierten Lösung;
Splitverhältnis 1:10; Temperaturprogramm siehe Abbildung.

Die Enantiomerenausbeute an Mandelsäure beträgt etwa 6 bis 13 %, abhängig von den gaschromatographischen Bedingungen. Das Resultat zeigt jedoch, daß mit dem System Keratin/Hämin asymmetrische Hydroxylierungen katalysiert werden können. Die Spezifität ist allerdings noch sehr gering. Durch systematische Veränderungen der Proteinkomponente kann möglicherweise eine Verbesserung der Enantiomerenausbeute erzielt werden.

7. Vergleiche zwischen den einzelnen Systemen

7.1. Substrat Anilin

Einige der hier untersuchten polymeren Modellsysteme sollen mit dem Enzym und niedermolekularen Systemen verglichen werden. Als Substrat wurde Anilin gewählt.

Enzym Cytochrom P_{450}:

Anilin wird von P_{450} zu para- und ortho-Aminophenol hydroxyliert. Je nach Tierart liegen die para-/ortho-Verhältnisse zwischen 15 (Springmaus) und 0,4 (Katze). Bei Kaninchen, Ratte und Maus treten mittlere Werte um 5 auf. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist für ein Enzym recht langsam. Die turn-over-Zeit liegt bei etwa 3 Sekunden für einen Reaktionszyklus (88).

Niedermolekulare Modellsysteme:

Einige niedermolekulare Modellsysteme können Anilin ebenfalls zu para- und ortho-Aminophenol umsetzen. Die turn-over-Zeiten sind aber um den Faktor 10^4 höher als beim Enzym, während die para-/ortho-Verhältnisse ähnlich sind. (siehe Tabelle 6).

Polymere Modellsysteme:

Mit den hier entwickelten polymeren Modellsystemen kann Anilin rund 30 mal schneller hydroxylisiert werden als mit den niedermolekularen Systemen. Mit dem Modellsystem IV

und Thioglykolsäure als Reduktionsmittel läuft die Reaktion am besten ab. (siehe Tabelle 6).

7.2. Substrat Phenylessigsäure

Niedermolekulare Modellsysteme:

Wie bereits in Kap. 6. beschrieben wurde, können niedermolekulare Modellsysteme Phenylessigsäure zu ortho-, meta- und para-Hydroxyphenylessigsäure sowie Mandelsäure hydroxylieren. Die turn-over-Zeiten liegen dabei ungefähr bei 80 Stunden. Die Hydroxylierung des aromatischen Ringes ist im Vergleich zur Seitenkette bevorzugt.

Polymere Modellsysteme:

Die beiden Systeme IV und V eignen sich gut für die Hydroxylierung von Phenylessigsäure. Im Vergleich zu den niedermolekularen Systemen wurde die Reaktionsgeschwindigkeit um etwa den Faktor 30 gesteigert. Die turn-over-Zeiten liegen für beide Systeme etwa bei 150 min. pro Zyklus.

Mit System V wird Phenylessigsäure zu ortho-Hydroxyphenylessigsäure, wenig Mandelsäure und vermutlich zu ortho-Hydroxyphenylmandelsäure umgesetzt.
Auffallend ist dagegen die Bildung von ortho- und meta-Hydroxyphenylessigsäure mit System IV. Wahrscheinlich verläuft hier die Reaktion nach dem Epoxidmechanismus:

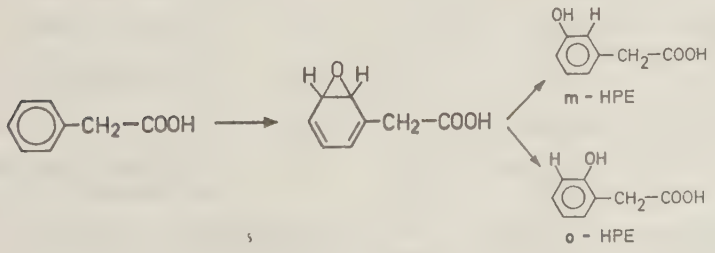


Abbildung 39

Die beiden Systeme IV und V sind relativ leicht herstellbar. Im Vergleich zu den niedermolekularen Systemen sind die Reaktionsgeschwindigkeiten wesentlich gesteigert worden. Mit beiden Systemen kann in Wasser gearbeitet werden, was für einen Einsatz beim oxidativen Abbau von persistenten Substanzen wichtig wäre.
Da der Schwefelligand im System IV variabel ist, kamm man ihn für jedes Substrat optimieren. Am Beispiel der Anilinhydroxylierung sieht man den Einfluß des Mercaptans: mit Thioglykolsäure läuft die Reaktion schneller als mit Mercaptoäthanol.
Ein weiterer Vorteil dieser beiden Systeme ist auch, daß sie sich leicht vom Reaktionsgemisch abtrennen lassen.

Tabelle 6: Vergleich der Hydroxylierung von Anilin und Phenylessigsäure mit verschiedenen Modellsystemen

System	Substrat	turn-over-Zeit	Isomerenverhältnisse
Hämin/Met/Imi/DMF	Anilin	22 h	17:1 o-/p-Aminophenol
Udenfriend	Anilin	17 h	-
IV + Thioglykolsäure	Anilin	40 min.	7:1 o-/p-Aminophenol
IV + Met	Anilin	2,5 h	8:1 o-/p-Aminophenol
IV + $NaJO_4$	Anilin	1,5 h	nur ortho-Hydroxyanilin
IIa + Met	Anilin	1,7 h	6:1 o-/p-Aminophenol
III + $S_2O_4^{2-}$	Anilin	3 h	1:1 o-/p-Aminophenol
VI + $S_2O_4^{2-}$	Anilin	*	nicht bestimmt
IV + Cys	Phenylessigsäure	2,5 h	1:1 o-/m-Hydroxyphenylessigsäure
V + Thioglykolglykolsäure	Phenylessigsäure	2,4 h	hautpsächlich ortho-HPE
Hämin/Cys/His	Phenylessigsäure	67 h	5:4:1 p-:o-:m- HPE

* sehr geringe Ausbeuten

8. Diskussion und Ausblick

Mit den meisten der bisher entwickelten Modellsysteme für Cytochrom P_{450} (39-48) wollten die Autoren hauptsächlich strukturelle und mechanistische Fragen beantworten. Erst in neuerer Zeit (49-52) wurden Modellsysteme entwickelt, mit welchen das biologische Prinzip der Enzymkatalyse für die Organische Chemie ausgenutzt werden sollte. Das Ziel war, Katalysatoren für die von P_{450} katalysierte Reaktionen zu entwickeln. Das war neben dem mechanistischen Aspekt auch das Hauptziel dieser Arbeit.

Ausgehend vom niedermolekularen System Hämin/Mercaptoäthanol/Imidazol/DMF (51,53) sollten Modellsysteme synthetisiert werden, die folgende Eigenschaften haben:

a) schnellere Substratumsetzungen
b) leichte Abtrennbarkeit von den Reaktionspartnern
c) spezifischere Hydroxylierung der Substrate (für organische Synthesen)
d) Einsetzbarkeit in Wasser (im Hinblick auf Abwasserreinigung).

Ursprünglich war geplant, die beiden Liganden Cystein und Histidin am Protoporphyrin selbst zu fixieren. Dadurch sollte die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht werden. Dieses Modellsystem sollte dann zwecks leichterer Abtrennung an einem festen Träger gebunden werden. Versuche mit an Al_2O_3 adsorbiertem Häminbishistaminamid zeigten Fortschritte im Vergleich zu (51,53). Allerdings war die Beladung des Trägers sehr gering und mit Wasser wurde der Häminkomplex wieder eluiert. Solche Systeme, bei denen die Liganden kovalent am Hämin gebunden sind, haben auch noch andere Nachteile:
Die Synthese von Häminderivaten mit zwei verschiedenen Resten an den Propionsäuregruppen ist kompliziert.

Da im Laufe der Hydroxylierung auch das Porphyringerüst abgebaut wird (53), muß diese schwierige Synthese immer wiederholt werden, um das System zu regenerieren. Aufgrund dieser Erfahrungen wurde ein ganz anderer Weg eingeschlagen: Die Liganden für Hämin wurden an einem polymeren Träger fixiert. Dies entspricht eher dem natürlichen Vorbild, bei dem ja auch das Hämin von funktionellen Gruppen des Proteins koordinativ gebunden wird. An diese funktionalisierte Trägerpolymere wurde Hämin i.a. koordinativ gebunden. Es wurde vom Lösungsmittel nicht ausgewaschen, die Bindung ist also genügend fest.
Die Herstellung von Modellsystemen aus einem Satz verschiedener Polymere und Hämin hat folgende Vorteile im Vergleich zu dem anfangs erwähnten Weg:

a) man braucht keinen zusätzlichen Träger, die Beladung ist optimal
b) Die Synthese dieser Polymere ist einfacher als die kovalente Verknüpfung der Liganden mit Hämin
c) Abgebautes Hämin kann ersetzt werden, das Polymer bleibt erhalten
d) Durch Variation der funktionellen Gruppen am Polymer können verschiedene Eigenschaften (z.B. Wasserlöslichkeit) gezielt geändert werden.
e) Möglichkeit des Einbaus von definierten Gruppen (sterisch wirksame, Nachbargruppeneffekt) in die Polymere
f) Die polymeren Liganden können auch mit anderen Metalloporphyrinen zu Komplexen umgesetzt werden.

Betrachtet man die Ergebnisse dieser Arbeit, so zeigt sich, daß die oben geforderten Eigenschaften der Modellsysteme tatsächlich auf dem hier eingeschlagenen Weg erreicht wurden:

- Die Reaktionsgeschwindigkeit der Hydroxylierungen sind erheblich gesteigert worden. Teilweise wurden Substrate

erst von einem polymeren System hydroxyliert (Tryptophan).
- Die polymeren Systeme lassen sich einfach abtrennen.
- Die Modellsysteme können auch in Wasser eingesetzt werden. Damit können eventuell schwer abbaubare organische Stoffe im Abwasser oxidativ angegriffen werden.
- Die unterschiedlichen Reaktionsprodukte mit Phenylessigsäure bei System IV und V zeigen, daß eine Lenkung der Reaktion über das Polymer möglich ist.

Eine wichtige Rolle beim Ablauf des Reaktionszyklus spielt das Reduktionsmittel, da die Reduktion des Enzym-Substrat-Komplexes die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt.
Durch die Optimierung dieser Komponente wäre sicher eine Steigerung der Ausbeuten möglich. Außerdem kann vielleicht durch die gezielte Variation der anderen Komponenten (Polymer, Metalloporphyrin, Lösungsmittel) ein System synthetisiert werden, das auch eine praktische Anwendung (organische Synthese mit bestimmten Substraten, oxidativer Abbau) findet.

C. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Chemikalien und Materialien

Grundchemikalien und Reagenzien:
Fa. Merck, Fa. Merck-Schuchard, Fa. Fluka, Fa. EGA, Fa. Roth, Fa. Baker, Fa. Sigma, Fa. Serva

Lösungsmittel:
Die verwendeten Lösungsmittel wurden nach (89) getrocknet und gereinigt.

Gase:
Als Schutzgas und Druckgas wurde Drei-Ring-Stickstoff der Fa. Messer-Griesheim verwendet.

Dünnschicht-Platten:
Kieselgel 60 F_{254}, Fa. Merck

Säulenmaterial (HPLC):
Fa. Merck, Machery u. Nagel. Fa. Whatman

Diaflo-Membranen:
Fa. Amicon, Oosterhout

Spezielle Chemikalien:
Hämin wurde aus Rinderblut isoliert
Vinylimidazol - Fa. Fluka
Copolymer EMA - Fa. Serva
Mercaptane - Fa. Merck, Fa. Fluka, Fa. Diamalt

2. Geräte

IR - Perkin-Elmer Infracord
ESR - Varian EC 1365 E
Elementaranalyse - Perkin-Elmer 240
pH-Meter - E 512 Metrohm
Schmelzpunktbestimmung - Apparat n. Tottoli Typ SMP 20
Fa. Büchi

Ultrafiltrationszellen - Fa. Amicon, Oosterhout
Lyophilisator - Cont.Freeze Dryer, New Brunswick
UV- und VIS-Lampe - Desaga
Analysenwaage - Sartorius
Potentiograph mit Silberelektrode - Metrohm E 436
HPLC - Waters Modell M 6000 A
Spectra Physics SP 8000
UV-Detektor - UVIKON 720 LC Kontron
Schreiber - Phillips PM 8220
Ultraschall-Bad - Sourex-Bandelin RK 102 H
Gaschromatograph - Carlo Erba Fractovap 2350 und 2101
Integrator - Spectra Physics System I
Glaskapillarsäulen - (20 x 0.3 mm) belegt mit "Chirasil-Val", Filmdicke 0,1

Danken möchte ich Frl. Förstel für die Durchführung der IR-Messungen und Herrn Wurmstich für die Elementaranalysen. Herrn G. Nicholson danke ich für die Bereitstellung der Chirasil-Val-Säulen und für die Durchführung der GC-MS-Untersuchungen.
Herrn M. Nieder danke ich für die Optimierung des HPLC-Systems.

3. Methoden

3.1. Dünnschichtchromatographie

Folgende Systeme wurden eingesetzt:

A Benzol/Methanol 80 : 20
B n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1
C Toluol/Ameisensäureethylester/Ameisensäure 5:4:1
D Chloroform/Methanol 9:1

Die Substanzflecken wurden mit folgenden Sprühreagenzien angefärbt.

1.) Ehrlich's-Reagenz	auf Aminogruppen (90)
2.) Gibbs-Reagenz	auf Phenole (91)
3.) Ninhydrinreagenz	auf Aminogruppen (92)
4.) Ethylendiaminreagenz	auf Catecholamine (93)
5.) Anisaledehyd-Schwefelsäure	auf Steroide (94)
6.) van Urk's-Reagenz	auf Indolderivate (79)
7.) Para-Nitro-Anilin	auf Phenole (95)

Die Analysenproben wurden zusammen mit Referenzsubstanzen auf Kieselgelplättchen aufgetragen und in DC-Kammern entwickelt. Die Chromatogramme wurden im UV-Licht sowie durch Ansprühen mit den obigen Reagenzien ausgewertet.

3.2. ESR-Spektroskopie

Sämtliche ESR-Messungen wurden bei -160° C durchgeführt. Zur Erzeugung dieser Temperatur wurde gasförmiger Stickstoff in einer Spirale durch ein mit flüssigem Stickstoff gefülltes Dewargefäß geleitet. Über einen Transfer-Dewar wurde der kalte gasförmige Stickstoff an den Probenort herangeführt. Die Temperatur wurde über einen Temperaturfühler gesteuert.
Die Lösungen und fein zerriebenen Feststoffe wurden in eisenfreie Quarzröhrchen eingefüllt und mit einem Varian EC 1365 E ESR-Spektrometer vermessen.
Bei Messungen unter Stickstoff (anaerob) wurden Kölbchen mit seitlich angeschmolzenem Quarzröhrchen verwendet. Sie konnten über einen Dreiwegehahn abwechselnd mit Stickstoff oder Vakuum beschickt werden.

Die Spektren wurden im allgemeinen unter folgenden Bedingungen aufgenommen:
Modulationsamplitude : 10 G
Mikrowellenenergie 10 mW
Mikrowellenfrequenz 9,1 GHz

3.3. Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Zur schnellen und quantitativen Analyse der Hydroxylierungssätze wurde teilweise die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) eingesetzt. Bei dieser Methode wird - wie bei der gebräuchlichen Säulenchromatographie - die Wechselwirkung einer Substanz mit einer festen Trägerphase und einer mobilen flüssigen Phase ausgenutzt. Die HPLC arbeitet im Gegensatz zur drucklosen Säulenchromatographie mit Drucken zwischen 50 und 150 at.
Dadurch werden die Trennungen schärfer, die Trennzeiten kürzer und man kann hochempfindliche Detektoren (UV und Fluoreszenz) einsetzen. Die Nachweisgrenze reicht bis in den pico-Mol-Bereich.
Für die Trennung der Aminophenole wurde ein Kationenaustauscher verwendet. Als mobile Phase wurde ein 0,1 molarer Phosphatpuffer (pH 2,9) eingesetzt. Dabei bilden sich aus den Aminophenolen Aniliniumsalze. Diese Kationen werden unterschiedlich gut am Austauscherharz festgehalten.

Für die Trennung der verschiedenen Hydroxyprodukte von Progesteron wurde eine Kieselgelsäule (SI 60) verwendet. Als Eluiermittel kam wsssergesättigtes Chloroform zum Einsatz.
Beide Eluiermittel wurden vor der Verwendung in einem Ultraschallbad von gelösten Gasen befreit.

4. Synthesen

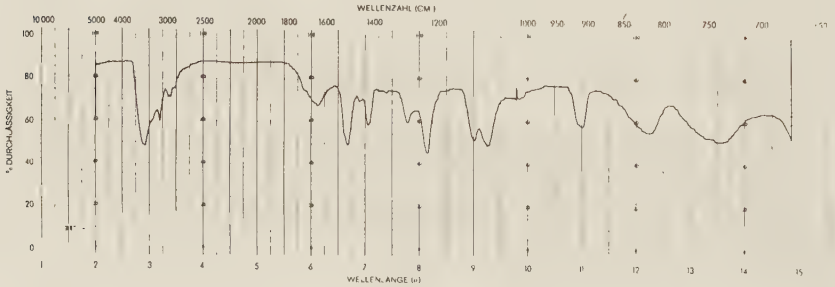
4.1. Poly-N-Vinylimidazol

Poly-N-Vinylimidazol wurde durch radikalische Polymerisation von N-Vinylimidazol erhalten. Abweichend von der Literatur (96) wurde die Reaktion im Dreihalskolben und nicht in einer zugeschmolzenen Ampulle durchgeführt.
10 g N-Vinylimidazol und 150 mg Azoisobutyronitril (AIBN) wurden in 100 ml wasserfreiem Benzol gelöst und 3 Stunden

am Rückfluß gekocht, während ein Stickstoffstrom durch die Lösung geleitet wurde. Es bildete sich ein weißer Niederschlag. Dieser wurde abgesaugt und in 200 ml Methanol wieder aufgenommen. Anschließend wurde das Polymer mit Aceton wieder ausgefällt. Die ausgefallene Masse war zähflüssig. Nach mehrmaligem Umfällen wurde das Produkt im Vakuum getrocknet. Es konnte im Mörser zu einem Pulver zerrieben werden. Die leicht gelbliche Substanz ist hygroskopisch.
Ausbeute: 6 g (60 % d.Th.)
Elementaranalyse: $C_5H_6N_2 \times 0.4\ H_2O$

ber.:	C 59,27	H 6,77	N 27,65
gef.:	C 59,36	H 7,64	N 26,53

IR-Spektrum von Poly-N-Vinylimidazol in KBr



Charakteristische Schwingungsbanden:

3400 cm^{-1}	N-H-Valenzschwingung
3120 cm^{-1}	=C-H-Valenzschwingung
2960 cm^{-1}	C-H-Valenzschwingung
3100-3600 cm^{-1}	-OH-Valenzschwingung
1640 cm^{-1}	H_2O-Deformationsschwingung
1500 cm^{-1}	N-H-Deformationsschwingung
1420 cm^{-1}	C-H-Deformationsschwingung

4.2. Poly-N-Vinylimidazol/Hämin

Zu einer wässrigen Lösung von 0.94 g Poly-N-Vinylimidzaol (10^{-1}Mol) in 30 ml Wasser wurden unter Rühren 65 mg Hämin (10^{-4}Mol), das in wenig Natronlauge gelöst war, gegeben. Aus der Lösung flockte ein roter Niederschlag aus. Dieser wurde abfiltriert und mehrmals mit Wasser ausgewaschen. Nach dem Trocknen im Vakuum war das Material sehr hart. Es wurde im Mörser zu einem Pulver zerrieben.

4.3. Polyacrylcystein

a) Bisacrylcystin

24 g L-Cystin wurden in 100 ml 10%-iger NaOH gelöst und auf 5° C abgekühlt. 27.2 g Acrylchlorid und 120 ml 10%-ige Natronlauge wurden unter Rühren zugetropft. Nach 2 Stunden Rühren wurde mit HCl angesäuert. Es schied sich eine ölige Masse ab. Der Überstand wurde abdekantiert und die Substanz mehrmals mit Wasser gewaschen. Das Produkt wurde aus Methanol/Wasser 30/70 umkristallisiert und im Vakuum getrocknet.
Ausbeute: 23 g (62 % d.Th.)
Fp. 80° C
Elementaranalyse:

ber.:	C 41.36	H 4.62	N 8.04	S 18.4
gef.:	C 43.59	H 6.45	N 6.59	S 14.91

b) Polyacrylcystein

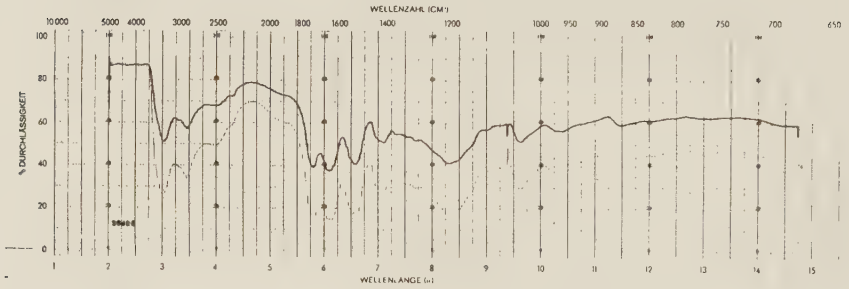
10 g Bisacrylcystin und 100 mg AIBN wurden in 60 ml Äthanol gelöst. Durch die Lösung wurde ein Stickstoffstrom geleitet und langsam auf 70° C erhitzt. Innerhalb von 3 Stunden fiel eine weiße Masse aus. Zur weiteren Reinigung wurde das Polymer mehrmals mit Äthanol aufgerührt und wieder abgesaugt.
Ausbeute: 7.8 g (78 % d.Th.)

Elementaranalyse:

ber.: C 41.36 H 4.62 N 8.04 S 18.4

gef.: C 43.38 H 6.47 N 7.14 S 15.31

IR-Spektrum von Polyacrylcystin in KBr



Charakteristische Schwingungsbanden:

3300 cm^{-1}	N-H-Velenzschwingung
2900 cm^{-1}	C-H-Valenzschwingung
1728 cm^{-1}	C=O-Valenzschwingung
1640 cm^{-1}	C=O-Valenzschwingung

c) Polyacrylcystein

3 g Polyacrylcystin wurden in 40 ml Wasser suspendiert. Dazu wurden 5 ml Mercaptoäthanol hinzugefügt und der pH-Wert auf 8 eingestellt. Nach etwa 30 min. Rühren hat sich das Polymer gelöst. Diese Lösung wurde in eine Ultrafiltrationszelle gegeben und 2 Tage an einer PM-10-Membran ultrafiltriert. Dann wurde das Filtrat lyophilisiert.
Ausbeute: 0.7 g (23 % d.Th.) (Kolben zerbrochen)
Elementaranalyse:

ber.: C 41.13 H 5.17 N 7.99 S 18.29

gef.: C 43.53 H 6.08 N 6.91 S 15.95

Von dieser Substanz wurde eine SH-Gruppenanalyse gemacht (57).
Gefunden: 85 % d.Th. Lit. (58) 79 % d.Th.

Polyacrylcystein/Hämin

250 mg Polyacrylcystein wurden in 30 ml Wasser gelöst. Dazu wurden 15,7 mg Hämin, gelöst in 5 ml 4% NaOH, gegeben. Der pH wurde auf 6.0 eingestellt. Man erhielt eine klare braune Lösung.

4.4. Acrylamid/Vinylimidazol-Copolymer

2.3 g Vinylimidazol (2.5×10^{-2} Mol), 7.1 g Acrylamid (10^{-1} Mol) und 60 mg AIBN wurden in 50 ml Methanol gelöst. Durch die Lösung wurde 30 min. lang Stickstoff geleitet und anschließend 2 Stunden am Rückfluß gekocht. Es fiel ein weißer Niederschlag aus. Dieser wurde abgesaugt und das Polymer in Wasser gelöst. Die wässrige Lösung wurde an einer PM-10-Membran ultrafiltriert und lyophilisiert.
Ausbeute: 6.2 g (66 % d.Th.)
Elementaranalyse:
gef.: C 47.06 H 6.51 N 18.84

daraus Monomerenverhältnis berechnet:
Vinylimidazol : Acrylamid 1 : 11.3

4.5. Acrylamid/Vinylimidazol-Copolymer + Hämin (System II)

Zu einer Lösung von 0.9 g Copolymer (10^{-3} Mol) Imidazol in 100 ml Wasser wurden 65 mg Hämin (10^{-4} Mol) zugegeben. Man erhielt eine rote Lösung.

4.6. Acrylamid/Vinylimidazol/Hämin-Copolymer (System IIa)

0.94 g Vinylimidazol (10^{-2}Mol), 3.6 g Acrylamid ($5x10^{-2}$ Mol) und 326 mg Häminchlorid ($5x10^{-4}$Mol) wurden in 50 ml Wasser bei pH 8 gelöst. Die Lösung wurde unter Durchleiten von Stickstoff auf 70° C erhitzt. Wenige Tropfen TEMED und eine Spatelspitze Ammoniumpersulfat wurden zugegeben. Nach 3 Stunden bei 70° C war die Lösung zähflüssig. Beim Eingießen der Lösung in ein Gemisch aus Wasser und Aceton (1:1) fiel der Häminkomplex aus. Der Niederschlag wurde abgesaugt und in Wasser suspendiert. Nach erneuter Zugabe von Aceton wurde der Niederschlag wieder abfiltriert. Nach der Trocknung im Vakuum war die rote Substanz ebenfalls sehr hart. Sie wurde im Mörser zu einem Pulver zerrieben.

4.7. Acrylamid/Bisacrylcystamin-Copolymer

a) Bisacrylcystamin

8 g Cystamin-Dihydrochlorid wurden in 80 ml 3.12 molarer NaOH gelöst. Dazu wurden 8.6 ml in 80 ml Chloroform gelöstes Acrylchlorid gegeben. Dieses Gemisch wurde 15 min. lang bei 50° C gut gerührt. Die Phasen wurden getrennt, solange die Temperatur noch um 50° C lag. Nach dem Abkühlen der Chloroformphase fiel das Produkt aus. Es wurde aus Chloroform umkristallisiert.

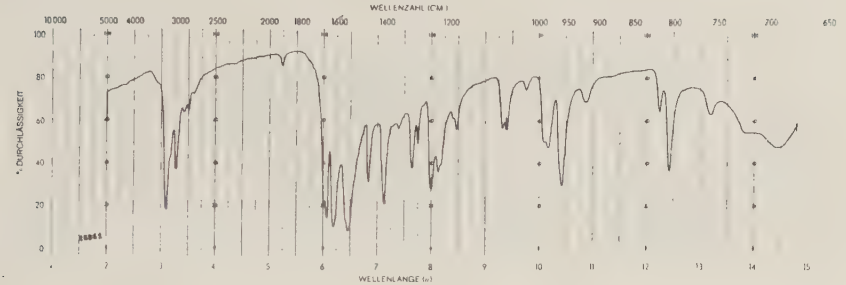
Fp. 121° C Lit. 121-123 (97)

Ausbeute: 6 g (67 % d.Th.)

Elementaranalyse:

ber.:	C 46.12	H 6.19	N 10.76	S 24.62
gef.:	C 45.71	H 6.14	N 10.57	S 24.80

IR-Spektrum von Bisacrylcystamin in KBr



Charakteristische Schwingungsbanden:

3230 cm^{-1}	N-H-Valenzschwingung
3060 cm^{-1}	=C-H-Valenzschwingung
1650,1618 cm^{-1}	C=O-Valenzschwingung des ungesättigten Amidsystems
800-100 cm^{-1}	out of plane-Deformationsschwingungen der olefinischen C-H

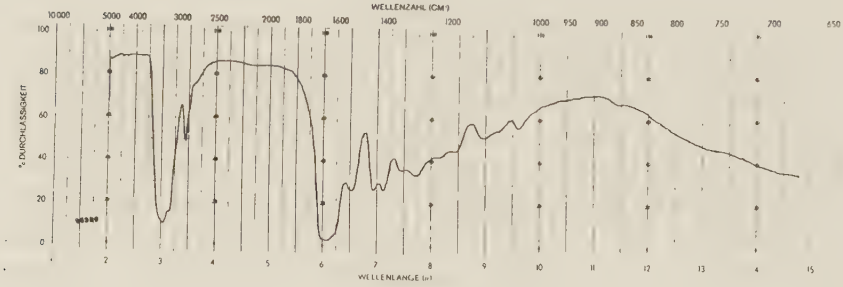
b) Acrylamid/Bisacrylcystamin-Copolymer

7.1 g Acrylamid (10^{-1}Mol), 3.25 g Bisacrylcystamin (2.5 x 10^{-2}Mol SH) und 100 mg AIBN wurden in 100 ml Äthanol gelöst. Durch die Lösung wurde Stickstoff geleitet und erwärmt. Ab 50° C wurde die Lösung trübe. Nach 3 Stunden Kochen bei 75° C war ein weißer Brei ausgefallen. Er wurde mehrfach mit Äthanol aufgerührt und wieder abgenutscht. Nach dem Trocknen erhielt man ein weißes Pulver.
Ausbeute: 7.8 g (75 % d.Th.)
Elementaranalyse:

gef.:	C 45.72	H 7.24	N 14.93	S 8.11
ber.:	C 45.40	H 7.02	N 15.13	S 8.64

für Acrylamid: 1/2 Bisacrylcystamin (3:1) + 7.3 % H_2O

IR-Spektrum des Copolymers aus Acrylamid/Bisacrylcystamin



Charakteristische Schwingungsbanden:

3300 cm^{-1}	N-H-Valenzschwingung
2900 cm^{-1}	C-H-Valenzschwingung
3100-3600 cm^{-1}	verschiedene C=O-Valenzschwingung der Amidgruppen.

1 g dieses Polymers wurde in Wasser suspendiert, mit 2-3 ml Mercaptoäthanol versetzt und bei pH 8 gerührt. Nach kurzer Zeit hatte sich das Polymer gelöst.

4.8. Acrylamid/Vinylimidazol/Bisacrylcystamin-Copolymer

3.6 g Acrylamid ($5x10^{-2}$Mol), 0.94 g Vinylimidazol (10^{-2}Mol) und 1.3 g Bisacrylcystamin (10^{-2}Mol SH) wurden in 50 ml Wasser bei 70° C gelöst. Dann wurde eine Stunde lang bei dieser Temperatur Stickstoff durch die Lösung geleitet. Anschließend wurden zu der heißen Lösung 10 Tropfen TEMED und 2 Spatelspitzen Ammoniumpersulfat zugegeben und gut durchgeschüttelt. Nach ungefähr 2 min. bildete sich schlagartig ein Gel. Zur Reduktion der Disulfidgruppen wurden zerkleinerte Gelstücke in Wasser gegeben. Nach

Zugabe von 2 ml Mercaptoäthanol ging das Polymer beim Erwärmen und Rühren der Mischung in Lösung. Mit 2 g Natriumdithionit kann man das Polymer ebenfalls sehr gut in Lösung bringen.

4.9. Bisacrylcystamin/Vinylimidazol/Acrylamid/Hämin-Copolymer (System III)

3.6 g Acrylamid ($5x10^{-2}$Mol) und 1.3 g Bisacrylcystamin (10^{-2}Mol) wurden in 50 ml Wasser bei 70-80°C gelöst. Dazu wurden 326 mg Häminchlorid ($5x10^{-4}$Mol) in wenig verdünnter NaOH zugegeben. Die Lösung ist klar und grünlich. Nun wurden 0.94 g Vinylimidazol hinzugefügt und der pH auf 8 eingestellt. Die Lösung färbte sich tiefrot. Durch die heiße Lösung wurde 30 min. lang Stickstoff geleitet und kräftig gerührt. Nach Zugabe von 10 Tropfen TEMED und 50 mg Ammoniumpersulfat entstand nach etwa 5 min. eine gelartige Masse. Die Entwässerung des Gels im Vakuum lieferte ein sprödes hartes Material, welches pulverisiert wurde.

Das rote Gel wurde mit wässriger Natriumdithionit-Lösung versetzt und gerührt. Das Polymer ging in Lösung.

4.10. Veresterung von Polyvinylalkohol mit Cystein und Histidin

10 g Cystein-Hydrochlorid ($6,3x10^{-2}$Mol), 11 g Polyvinylalkohol ($2,5x10^{-1}$Mol) und 12 g Histidin-Hydrochlorid ($6,2x10^{-2}$Mol) wurden in 200 ml Wasser gelöst und der pH-Wert auf 0 eingestellt. Dieses Gemisch wurde unter Durchleiten von Stickstoff 2 Stunden am Rückfluß gekocht. Die gelbliche, viskose Lösung wurde an einer PM-10-Membran 2 Tage kontinuierlich ultrafiltriert. Anschließend wurde das Filtrat lyophilisiert.
Ausbeute: 10.2 g
Elementaranalyse:

gef.:	C 46.10	H 7.14	N 4.92	S 2.95	Cl 10.35
ber.:	C 46.76	H 7.50	N 5.32	S 3.04	Cl 9.98

für PVA: Cys und PVA:His je 8:1 (25 % Gesamtveresterung).

4.11. System VI: Polyvinylalkohol-Cystein Histidin-Ester/Hämin

400 mg des mit Cystein und Histidin veresterten Polyvinylalkohols wurden in 50 ml 0,1N HCl gelöst. Die Lösung wurde mit NaOH alkalisch gemacht (pH 8), dabei flockte das Polymer aus. Nach der Zugabe von 50 mg Hämin bildete sich ein grüner Niederschlag. Der klare Überstand wurde abdekantiert und der Niederschlag erneut in Wasser aufgerührt. Nach einiger Zeit setzte sich wieder ein grüner Flaum ab. Nach der Zugabe von etwa 1 g Natriumdithionit färbte sich der grüne Niederschlag rot.

4.12. Umsetzung des Copolymers aus Ethylen und Maleinsäureanhydrid mit Imidazol

710 mg Ethylen/Maleinsäureanhydrid-Copolymer (7:4) (EMA), ($5x10^{-3}$ Mol) und 646 mg Imidazol ($9,5x10^{-3}$ Mol) wurden in einem Becherglas gemischt und mit etwa 30 ml Wasser versetzt. Es bildete sich eine kleisterartige Masse. Nach der Zugabe von weiteren 100 ml Wasser wurde kräftig gerührt. Nachdem 50 mg Ethylendiamin zugegeben wurden, versetzte man unter starkem Rühren langsam mit konzentrierter HCl. Ab pH 7,5 - 7 fiel ein flaumiger Niederschlag aus. Der Niederschlag wurde abfiltriert und mehrmals mit Wasser aufgerührt.
Ausbeute: 600 mg (57 % d.Th.)

Die Elementaranalyse ist hier nicht sehr sinnvoll, da wohl ein Gleichgewicht zwischen Carboxylgruppen und ihren verschiedenen Salzen ($Na^{\oplus}$, Imidazoliumkation) vorliegt.

4.13. Umsetzung des obigen Polymers mit Hämin

Zu einer Suspension des obigen Polymers aus 355 mg EMA ($2{,}5 \times 10^{-3}$ Mol), 323 mg Imidazol ($4{,}7 \times 10^{-3}$ Mol) und wenig Ethylendiamin in etwa 100 ml H_2O wurden bei pH 7,5 65 mg Hämin (10^{-4} Mol) in wenig NaOH unter Rühren zugegeben. Die Suspension färbte sich tiefrot. Nach 30 min. hatte sich ein roter flaumiger Niederschlag abgesetzt. Normalerweise wurde für die Hydroxylierungsansätze diese Suspension frisch angesetzt. Der Niederschlag wurde auch abfiltriert, mehrfach gewaschen, getrocknet und im Mörser fein zerrieben.

4.14. Keratin-Isolierung

5 g rohes pulverisiertes Keratin wurden in 100 ml Wasser suspendiert. Dazu wurden 10 ml Mercaptoessigsäure gegeben, mit NaOH auf pH 10 eingestellt und über Nacht gerührt. Die Lösung wurde filtriert. Aus dem Filtrat wurde durch Ansäuern mit HCl bis pH 4,1 das gelöste Keratin wieder ausgefällt. Das rohe Keratin wurde abzentrifugiert und das Lösungsmittel abdekantiert. Der Niederschlag wurde nun bei pH 7 wieder gelöst. Dieser Vorgang - Ausfällen und wieder Lösen - wurde 6 mal wiederholt. Anschließend wurde die neutrale Keratinlösung an einer PM-10-Membran 2 Tage kontinuierlich ultrafiltriert. Das Filtrat wurde lyophilisiert.

Ausbeute: 370 mg (Verluste bei der Ultrafiltration)

Elementaranalyse:

gef.: C 43.63 H 5.72 N 11.97 S 2.64

zum Vergleich

α-Wollkeratose

C 47.08 H 6.65 N 16.11 S 2.90

ß-Wollkeratose

C 45.99 H 6.91 N 15.94 S 2.72

4.15. System V (Keratin/Hämin)

5 g Rohkeratin wurden wie oben beschrieben reduziert und bei pH 4.1 ausgefällt. Der Niederschlag (ungefähr $2x10^{-3}$ Mol Cys) wurde in 50 ml Wasser bei pH 7 gelöst. Zu dieser Lösung wurden 65 mg, in wenig Natronlauge gelöstes Hämin (10^{-4}Mol) gegeben. Man erhielt eine braune klare Lösung.

5. Hydroxylierungsreaktionen

5.1. Hydroxylierungen mit System IV

5.1.1.1. Anilin als Substrat, Thioglykolsäure als Schwefelligand

aus 355 mg ($2,5x10^{-3}$Mol) EMA, 323 mg Imidzaol ($4,75x10^{-3}$Mol), wenigen Tropfen Ethylendiamin und 65 mg Hämin (10^{-4}Mol) wurden 100 ml wässrige Suspension von System IV hergestellt. Dazu wurden 0.22 ml Anilin ($2.41x10^{-3}$Mol) und 2 ml Thioglykolsäure zugegeben. Mit NaOH wurde der pH auf 6.1 eingestellt. Die Temperatur betrug 25° C. Diese Suspension wurde an Luft gerührt.
Nach 2 1/4 Stunden, 3 1/2 Stunden, 9 1/2 Stunden und 20 Stunden wurden jeweils 5 ml des Reaktionsansatzes abpipettiert und das unlösliche Hämopolymer abzentrifugiert. Der Überstand war klar, er wurde direkt mit HPLC analysiert (Daten der Trennung siehe S. 48).
Die Ausbeuten an ortho- und para-Aminophenol wurden durch Flächenvergleich mit den Peaks der Eichlösungen berechnet.

5.1.1.2. Mercaptoäthanol als Schwefelligand

Anstelle von Thioglykolsäure wurde in einem anderen Ansatz 2 ml Mercaptoäthanol als Schwefelkomponente eingesetzt. Alle anderen Bedingungen waren gleich wie in dem oben beschriebenen Versuch.

Nach 6, 27 und 53 Stunden wurden jeweils 20 ml Reaktionslösung abpipettiert und mit Ether bei pH 7 extrahiert. Die Etherlösungen wurden auf 5 ml konzentriert und mit DC analysiert.
Laufmittel : A Sprühreagenz : Ehrlich-Reagenz.

5.1.2. Phenylessigsäure als Substrat

Aus 355 mg EMA ($2{,}5 \times 10^{-3}$ Mol), 323 mg Imidazol (4.75×10^{-3} Mol) und 65 mg Hämin (10^{-4} Mol) und wenigen Tropfen Ethylendiamin wurde eine wässrige Suspension von System IV hergestellt. Dazu wurden 680 mg Phenylessigsäure (5×10^{-3} Mol) und 1.21 g Cystein (10^{-2} Mol) in 150 ml Wasser gegeben. Die Lösung wurde auf pH 6 eingestellt und an Luft gerührt. Nach 24 Stunden wurden 25 ml Suspension abpipettiert und die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert. Der pH des Überstandes wurde auf 1 eingestellt und 3 mal mit je 20 ml Ether extrahiert. Der Etherextrakt wurde mit DC analysiert.
Laufmittel : C Sprühreagenz : Gibbs-Reagenz.
Die R_f-Werte und die charakteristischen Anfärbungen der Flecken stimmen mit ortho- und meta-Hydroxyphenylessigsäure überein. Mit para-Nitroanilin als Sprühreagenz zeigte sich, daß auch wenig Mandelsäure entstanden war. Eine grobe Abschätzung der Flecken von ortho- und meta-Hydroxyphenylessigsäure läßt auf einen Gesamtumsatz von etwa 20 % - bezogen auf die eingesetzte Phenylessigsäure - schließen.

5.1.3. Steroide als Substrate

5.1.3.1. Progesteron

315 mg Progesteron (10^{-3} Mol) wurden in 3 ml Mercaptoäthanol gelöst. Dazu wurden 200 mg System IV-Pulver (5×10^{-5} Mol Fe^{3+}) gegeben und gerührt. Nach 70 Stunden wurde der Ansatz mit DC im Laufmittel D untersucht. Die Flecken wurden mit Anisaldehyd-Schwefelsäure angefärbt.

Aufarbeitung:
Der Reaktionsansatz wurde in 20 ml Wasser gegossen. Die wässrige Suspension wurde 3 mal mit 20 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die Lösung wurde mit Na_2SO_4 getrocknet, einrotiert und wieder in 5 ml Chloroform aufgenommen. Diese Lösung wurde mit DC (Laufmittel D) und mit HPLC untersucht. Chromatogramme und Trennbedingungen siehe S. 52.
Die gaschromatographische Trennung der underivatisierten Hydroxylierungsprodukte wurden an einer 20 m langen OV 101-Säule ausgeführt.
Von den einzelnen Peaks wurden Massenspektren aufgenommen. Bedingungen: 80 eV, MAT 112 S

5.1.3.2. Testosteron und Östradiol

Reaktionsansatz Testosteron:

150 mg Testosteron (5.2×10^{-4} Mol) wurden in 3 ml Mercaptoäthanol gelöst. Dazu wurden 200 mg System IV (5×10^{-5} Mol Fe^{3+}) zugegeben und an Luft gerührt. Nach 90 Stunden wurde der gesamte Ansatz in 20 ml Wasser gegossen und die wässrige Phase mit Chloroform (10 ml) extrahiert. Der Chloroformextrakt wurde dünnschichtchromatographisch untersucht.
Laufmittel : D Sprühreagenz : Anisaldehyd Schwefelsäure

Reaktionsansatz Östradiol:

200 mg Östradiol (7.3×10^{-4} Mol) wurden in 10 ml Mercaptoäthanol gelöst. Dazu wurden 280 mg System IV-Pulver (8×10^{-5} Mol Fe^{3+}) zugegeben. Nach 24-stündigem Rühren an Luft wurde der Ansatz direkt mit DC (Laufmittel D, Sprühreagenz Anisaldehyd-Schwefelsäure) untersucht.

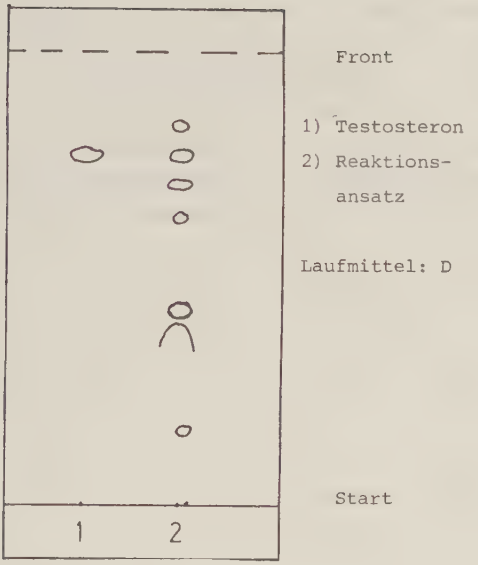


Abbildung 40:

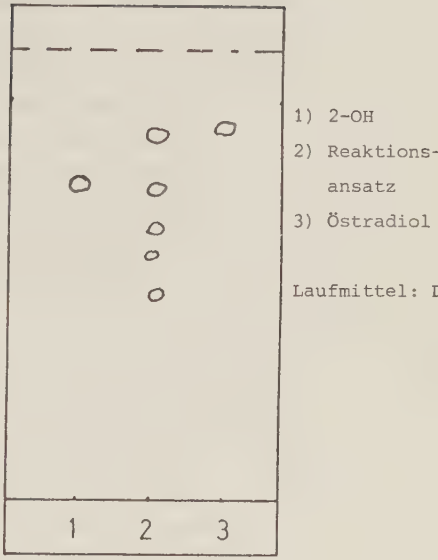


Abbildung 41:

5.1.4. Dopamin als Substrat

Aus 355 mg ($2{,}5 \times 10^{-3}$ Mol) EMA, 323 mg Imidazol (4.75×10^{-3} Mol), 65 mg Hämin (10^{-4} Mol) und wenig Ethylendiamin wurde eine wässrige Suspension von System IV hergestellt. Dazu wurden 950 Dopamin-Hydrochlorid (5×10^{-3} Mol) und 1,84 g Thioglykolsäure gegeben. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 400 ml. Der pH-Wert wurde auf 7.2 eingestellt.
Der Reaktionsansatz wurde nach 16, 68 und 138 Stunden direkt mit DC untersucht. Die Chromatogramme wurden in Laufmittel B entwickelt und mit drei verschiedenen Sprühreagenzien angefärbt: Ethylendiamin, Ninhydrin und Gibbs-Reagenz.

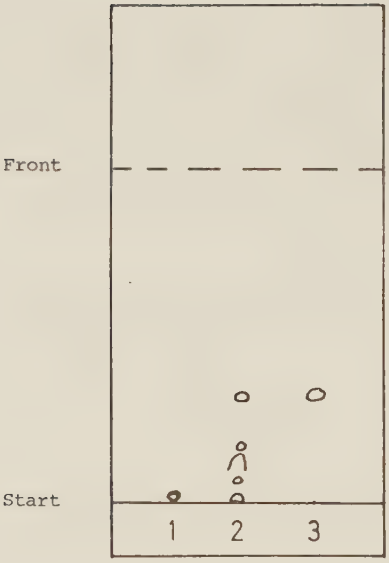


Abbildung 42:

1) 6-OH Dopamin
2) Reaktionsansatz nach 68 h
3) Dopamin

Laufmittel: B

5.2. Hydroxylierungen mit System V

5.2.1. Phenylessigsäure als Substrat

Zu der aus 5 g Rohkeratin und 65 mg Hämin (10^{-4}Mol) hergestellten Lösung (in 50 ml Wasser) wurden 150 mg Phenylessigsäure (1.1×10^{-3}Mol) zugegeben und der pH-Wert auf 7 eingestellt. Als Reduktionsmittel wurden 5 ml Thioglykolsäure eingesetzt. Nach 27 Stunden wurden 10 ml Probe vom Reaktionsansatz abpipettiert. Dazu wurden 30 ml Ether gegeben und der pH auf 4.5 eingestellt. Das Keratin fiel aus. Die Etherphase wurde abgetrennt. Die wässrige Phase wurde auf pH 1 eingestellt und nochmals mit 30 ml Ether extrahiert. Die vereinigten Etherextrakte wurden mit Na_2SO_4 getrocknet. Diese Lösung wurde mit DC untersucht.

Ein Teil der Etherlösung wurde zur Untersuchung der Mandelsäure aufgearbeitet.
Die Hälfte des Reaktionsansatzes wurde zu 0.2 g $LiAlH_4$ in 60 ml Ether innerhalb von 30 min. zugetropft. Nach 30 min. Rückflußkochen wurde die Reduktion mit Wasser und 20 %-iger H_2SO_4 abgestoppt. Die wässrige Phase wurde mehrfach mit Ether extrahiert. Die vereinigten Etherphasen wurden mit Wasser und Na_2CO_3-Lösung gewaschen. Dann wurde die Etherlösung über Na_2SO_4 getrocknet und filtriert.
Die Etherlösung wurde einrotiert und in ein Derivatisierungsgläschen überführt.
Die Reaktionsprodukte wurden zu Perfluorpropionsäureester umgesetzt (Derivatisierungsvorschrift siehe bei den niedermolekularen Reaktionsansätzen) und gaschromatographisch untersucht. Trennbedingungen siehe Abb. 38 S. 69.

Niedermolekulare Ansätze mit Phenylessigsäure

L-Cys/L-His:

3.1 g L-His ($2x10^{-2}$Mol), 2.4 g L-Cys ($2x10^{-2}$Mol), 65 mg Hämin (10^{-4}Mol) und 272 mg Phenylessigsäure ($2x10^{-3}$Mol) wurden in 50 ml einer Mischung aus 80 % Wasser und 20 % Aceton gerührt.

L-Cys/Imi:

2.4 g L-Cys ($2x10^{-2}$Mol), 1.36 g Imidazol ($2x10^{-2}$Mol), 65 mg Hämin (10^{-4}Mol) und 272 mg Phenylessigsäure ($2x10^{-3}$Mol) wurden in 50 ml Wasser/Aceton 80/20 gerührt.

Met/L-His:

3.1 g His ($2x10^{-2}$Mol), 4.2 ml Met ($2x10^{-2}$Mol), 65 mg Hämin (10^{-4}Mol) und 272 mg Phenylessigsäure ($2x10^{-3}$Mol) wurden mit Wasser/Aceton 80/20 auf 50 ml aufgefüllt und gerührt.

Alle drei Ansätze wurden folgendermaßen aufgearbeitet:

1) Die Ansätze wurden bis pH 1 angesäuert. Dann wurde mit Ether 4 mal ausgeschüttelt, über Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert, einrotiert und wieder in 20 ml absolutem Ether aufgenommen.
2) 1 g $LiAlH_4$ wurde in 50 ml Ether vorgelegt. Dann wurden die Etherextrakte zugetropft, eine Stunde gerührt und am Rückfluß gekocht.
3) Es wurde mit Eis gekühlt und dann vorsichtig mit Wasser versetzt.
4) 50 ml 20 %-ige Schwefelsäure wurde zugefügt, rasch gerührt bis beide Phasen klar wurden. Dann wurden die beiden Phasen getrennt. Die Wasserphase wurde noch 2 mal ausgeethert.
5) Die vereinigten Etherphasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, das Trockenmittel abfiltriert und der Ether zum größten Teil abgezogen.
   Die eingeengte Etherlösung wurde in ein 25 ml Meßkölbchen überführt und aufgefüllt.
7) Davon wurde 1 ml zur Derivatisierung eingesetzt:
   Der Ether wurde mit Stickstoff abgeblasen, dann wurden 0.5 ml CH_2Cl_2 und 0.15 ml PFP-Anhydrid zugegeben. Anschließend wurde dann 10 min. auf 110° C erhitzt. Nach erneutem Abblasen wurde mit Essigsäureethylester auf 1 ml aufgefüllt.

Die PFP-Derivate wurden gaschromatographisch untersucht (Bedingungen siehe S. 69).

5.2.2. L-Tryptophan als Substrat

Zu 50 ml einer aus 5 g Rohkeratin und 65 mg Hämin (10^{-4}Mol) hergestellten Lösung wurden 204 mg L-Tryptophan (10^{-3}Mol) zugegeben. 3 ml Thioglykolsäure wurden als Reduktionsmittel hinzugefügt und der pH auf 6.5 eingestellt.
Nach 24 Stunden wurde der Reaktionsansatz mit DC analysiert.

Laufmittel: B. Die Flecken wurden mit dem van Urks-Reagenz angefärbt.

Ansatz mit niedermolekularem System

200 mg L-Tryptophan (10^{-3}Mol) wurden in 25 ml Aceton/Wasser 80/20 und 10 ml Mercaptoäthanol gelöst. Dazu wurden 65 mg Hämin (10^{-4}Mol) gegeben. Der pH-Wert wurde mit H_3PO_4 auf 5 eingestellt. Die Reaktionsmischung wurde an Luft gerührt. Nach 90 Stunden wurden 10 ml entnommen, auf 2 ml eingeengt und mit DC untersucht.
Laufmittel: B. Die DC-Plättchen wurden mit dem Ehrlich-Reagenz besprüht. Es ergab sich kein Hinweis auf Tryptophanderivate.

5.3. Hydroxylierungen mit System II (Anilin als Substrat)

Zu einer Lösung aus 0.9 g Acrylamid/Vinylimidazol-Copolymer (10^{-3}Mol Imidazol) in 100 ml Wasser und 65 mg Hämin (10^{-4}Mol) wurden 2 ml Mercaptoäthanol und 0.1 ml Anilin (1.1×10^{-3}Mol) gegeben. Die Lösung wurde an Luft gerührt. Der Reaktionsansatz wurde nach 24 Stunden direkt mit DC untersucht. Laufmittel: A Sprühreagenz : Ehrlich-R.

Hydroxylierung mit System IIa

0.5 ml Anilin (5.48×10^{-3}Mol) wurden in 1.5 ml Mercaptoähtanol gelöst. Dazu wurden etwa 300 mg System II-Pulver (5×10^{-5}Mol) gegeben und gerührt. Nach 18 Stunden wurde der Reaktionsansatz direkt mit DC untersucht. Laufmittel: A. Die Flecken von ortho- und para-Aminophenol wurden mit Ehrlich's-Reagenz angefärbt. Die Ausbeute an Hydroxylierungsprodukten betrug etwa 10 % bezogen auf Anilin.

5.4. Hydroxylierungen mit System III (Anilin als Substrat)

Etwa ein Fünftel der gelartigen Masse, die bei der Copolymerisation von 3.6 g Acrylamid ($5x10^{-2}$Mol), 1.3 g Bisacrylcystamin (10^{-2}Mol SH), 326 mg Hämin ($5x10^{-4}$Mol) und 0.94 g Vinylimidazol (10^{-2}Mol) entstand, wurde in 60 ml Wasser aufgeschlämmt und 0.6 ml Anilin ($6.58x10^{-3}$Mol) addiert. Dazu wurde etwa 1 g Natriumdithionit zugegeben. Der pH-Wert betrug 6. Die Reaktionsmischung wurde an Luft gerührt und in Zeitabständen von 2-3 Stunden wurden 0.2-0.3 g $Na_2S_2O_4$ zugegeben. Nach 9 Stunden wurde der Reaktionsansatz direkt mit DC analysiert. Nach 50 Stunden wurde der pH-Wert der Lösung auf 7 eingestellt. Die wässrige Phase wurde 2 mal mit 40 ml Ether extrahiert. Die Etherlösung wurde über Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert und auf 5 ml eingeengt. Diese Etherlösung wurde mit DC im Laufmittel A untersucht. Die Flecken von ortho- und para-Aminophenol wurden wieder mit Ehrlich's-Reagenz sichtbar gemacht.

5.5. Hydroxylierung mit System VI (Anilin als Substrat)

Aus 400 mg in Wasser suspendiertem PHC und 65 mg Hämin (10^{-4}Mol) wurde ein grüner Niederschlag erhalten. Dieser wurde abfiltriert, ausgewaschen und erneut in etwa 50 ml Wasser suspendiert.
Dazu wurden 0.5 ml Anilin ($5.48x10^{-3}$Mol) und 1 g $Na_2S_2O_4$ gegeben und bei pH 6.5 gerührt. Bei der Untersuchung des Reaktionsansatzes mit DC im Laufmittel A und dem Ehrlich-Reagenz wurden nur geringe Umsätze an para- und ortho-Aminophenol gefunden.

5.6. Hydroxylierungen mit Natriumperjodat

Aus 710 mg EMA ($5x10^{-3}$Mol), 64.6 mg Imidazol ($9.5x10^{-3}$Mol) und wenigen Tropfen Ethylendiamin wurden 200 ml wässrige Suspension hergestellt. Davon wurden 80 ml entnommen und 50 mg Hämin ($0.77x10^{-4}$Mol) dazugegeben. Es fällt ein roter Niederschlag aus (System IV). Nun wurden 0.5 g $NaJO_4$ ($2.3x10^{-3}$Mol) und 0.2 ml Anilin ($2.24x10^{-3}$Mol) zugegeben und gerührt. Nach 18 Stunden wurde eine Probe entnommen, auf pH 7 eingestellt und mit Ether extrahiert. Die DC-Untersuchung (Laufmittel A, Ehrlich-Reagenz) zeigte, daß ortho-Aminophenol entstanden ist. Nach 18 Stunden Reaktionszeit wurden weitere 1.5 g $NaJO_4$ ($7x10^{-3}$Mol) zugegeben. Nach 44 Stunden war im Reaktionsansatz kein Anilin mehr nachweisbar.

D. ZUSAMMENFASSUNG

In der hier vorliegenden Arbeit wurden polymere Modellsysteme für das Enzym Cytochrom P_{450} entwickelt.
Das Ziel war - neben dem mechanistischen Aspekt - durch Nachahmen des Naturstoffes ein Modellsystem zu erhalten, das die Enzymreaktion katalysieren kann.
Ausgangspunkt der Arbeiten war das Enzym selbst und das niedermolekulare System Hämin/Mercaptoäthanol/Imidazol/DMF.

Dieses System ist in der Lage mit Luftsauerstoff verschiedene Substrate zu hydroxylieren. Die axialen Liganden am Hämin des Modellsystems, Mercaptoäthanol und Imidazol, wurden durch Polymere ersetzt, welche diese bereits als funktionelle Gruppen enthalten.
Dadurch wurden drei verschiedene Eigenschaften der Modellsysteme entscheidend verbessert:
1) Durch die Fixierung der Liganden am Hämin wurde die Geschwindigkeit der Hydroxylierungsreaktionen im Vergleich zu niedermolekularen Systemen teilweise erheblich gesteigert.
2) Durch die Verwendung von hydrophilen Polymeren konnten die Reaktionen in wässriger Lösung durchgeführt werden. Das Hämin wurde solubilisiert.
3) Die polymeren Systeme können leicht vom Lösungsmittel und den Substraten bzw. Metaboliten abgetrennt werden. Lösliche Systeme wurden durch Ultrafiltration abgetrennt, während unlösliche einfach abfiltriert wurden.
Außerdem deutete sich an, daß die Selektivität der Hydroxylierungen gesteuert werden kann. So bildeten sich bei der Hydroxylierung von Progesteron weniger Isomere als mit dem niedermolekularen System. Phenylessigsäure konnte - wenn auch mit geringer Enantiomerenausbeute - asymmetrisch zu Mandelsäure hydroxyliert werden.

Bei der Darstellung der Polymere wurden drei verschiedene Wege eingeschlagen:
Erstens wurden monomere Bausteine, die Imidazol- bzw. Cystein-Reste enthielen, polymerisiert oder copolymerisiert. Auf diese Weise wurden Polyvinylimidazol, Polyacrylcystein sowie die Copolymere aus Acralamid/Vinylimidazol, Acrylamid/Acrylcystamin und Acrylamid/Vinylimidazol/Acrylcystamin hergestellt.
Zweitens wurden Histidin- und Cysteinderivate in vorhandene Polymere eingebaut. Polyvinylalkohol wurde mit His und Cys verestert. Die Säureanhydridgruppen eines Copolymers aus Ethylen und Maleinsäureanhydrid wurden mit Imidazol zum Amid umgesetzt.
Schließlich wurde mit Keratin ein Biopolymer eingesetzt, welches zu einem großen Teil aus Cystin besteht. Nach der Reduktion der S-S-Gruppen lag lösliches Keratin mit den gewünschten Cysteinylresten vor.
Diese Palette verschiedener Polymere wurde mit Hämin umgesetzt. Die funktionellen Gruppen koordinieren am zentralen Eisenatom. Die Umgebung des Metallatoms wurde mit der ESR-Spektroskopie untersucht. Dabei zeigte sich, daß ähnliche ESR-Signale wie beim Enzym selbst auftreten. Auch die Verschiebung der g-Werte bei Zugabe von Substraten ist ähnlich wie bei P_{450} selbst und zwar in der Richtung und in der Größenordnung. Somit kann man diese polymere Häminkomplexe wohl zu recht als Modellsysteme für das natürliche Enzym bezeichnen.
Die Modellsysteme können verschiedene organische Moleküle hydroxylieren. Als Substrate wurden Anilin, Phenylessigsäure, die Steroide, Progesteron, Testosteron, und Östradiol sowie Dopamin und Tryptophan eingesetzt. Sie wurden von den einzelnen Modellsystemen unterschiedlich schnell und teilweise zu verschiedenen Produkten umgesetzt.

Diese wurden mit DC, HPLC, GC und GC-MS untersucht. Mit den Systemen IV und V wurden die meisten Substrate hydroxyliert. Die beste Umsatzrate (Mol Substrat pro Mol Enzymmodell in 40 min) für Anilin als Substrat konnte mit dem System IV und Thioglykolsäure als Reduktionsmittel erzielt werden. Die Reaktionsprodukte waren - wie beim Enzym - para- und ortho-Aminophenol.
Die turn-over Zeiten dieser beiden Systeme mit anderen Substraten liegen etwa zwischen zwei und drei Stunden. Phenylessigsäure wird hauptsächlich am aromatischen Ring in ortho- und meta-Stellung hydroxyliert. Mandelsäure tritt nur in geringen Mengen auf.
Tryptophan wird vermutlich ebenfalls am aromatischen Ring hydroxyliert, ebenso wie 3,4-Dihydroyphenyl-Ethylamin (Dopamin) aus dem wahrscheinlich 6-OH Dopamin entsteht.

Im Vergleich zu den niedermolekularen Modellsystemen ist die Reaktionsgeschwindigkeit bei den polymeren Systemen bis zu 30 mal größer. Bei Tryptophan konnte mit einem niedermolekularen System überhaupt keine Hydroxylierungsprodukte nachgewiesen werden, während mit dem System Keratin/Hämin (V) und Thioglykolsäure als Reduktionsmittel sehr gute Umsätze erzielt wurden.
Mit $NaJO_4$ als Oxendonator und dem Modellsystem IV konnte Anilin mit guten Ausbeuten hydroxyliert werden. Damit zeigte sich, daß auch die Eigenschaften von P_{450} als Oxentansferase simuliert werden können. Dies steht auch im Einklang mit den Ergebnissen anderer Autoren (82-84).
Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die These, daß ein polymergebundener Metallkomplex wesentlich bessere katalytische Eigenschaften haben kann, als das niedermolekulare System (55).
Die Strategie, ein kompliziertes Protein durch funktionalisierte Polymere zu ersetzen, und die Reduktionsäquivalente chemisch zu erzeugen, führte auch hier (98) zum Erfolg.

Folgende Faktoren bieten Ansatzpunkte zur Verbesserung der Systeme:

- Gezielte Variation der Polymerkomponenten,
- Einsatz verschiedener Metalloporphyrine,
- Optimierung des Reduktionsmittels, des pH-Wertes, des Lösungsmittels und der Temperatur,
- Arbeiten in O_2-Atmosphäre.

Ein derartig optimiertes System kann für spezifische Hydroxylierungen in der Organischen Chemie oder beim oxidativen Abbau biologisch resistenter Substanzen in der Abwasserreinigung Verwendung finden.

E. LITERATURVERZEICHNIS

1) O. Hayaishi: "Oxygenases", S. 1-29, Academic Press, New York 1962.
2) O. Hayaishi: Proceedings of the Plenary Sessions 33, 31 Sixth Int.Congress Biochemistry, New York City (1964) J.U.B.
3) H.S. Mason, Adv.Enzymol. 19, 79 (1957).
4) M. Klingenberg, Arch.Biochem.Biophys. 75, 376 (1958).
5) D. Garfinkel, Arch.Biochem.Biophys. 77, 493 (1958).
6) R.W. Estabrook, D.Y. Cooper, O. Rosenthal, Biochm.Z. 338, 741 (1963).
7) M. Katagiri, B.N. Ganguli, I.C. Gunsalus, J.Biol.Chem. 243, 3543 (1968).
8) I.C. Gunsalus, Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 349, 1610 (1968).
9) I.C. Gunsalus, J.R. Meeks, J.D. Lipscomb, P. Debrunner, E. Münch in: O. Hayaishi: Molekular Mechanisms of Oxygen Activation, S. 559, Academic Press, New York 1974.
10) S.F. Lewis, C.F. Wilcinson, J.W. Ray, Biochem.Pharmakol. 16, 1195 (1967).
11) A. Lindenmaier, L. Smith, Biochem.Biophys.Acta 93, 445 (1964).
12) P.R. Rich, Biochem.Soc.Trans. 3, 980 (1975).
13) S. Bauer, M. Kiese, Arch.Exp.Pathol.Pharmakol. 247, 144 (1964).
14) V. Ullrich, Z.Physiol.Chem. 350, 357 (1969).
15) D.S. Davies, P.L. Gigon, J.R. Gilette, Life Scie. 8, 85 (1969).
16) J. Axelrod, Biochem.J. 63, 634 (1956).
17) J.R. Gilette, J. Kamm, J.Pharmakol.Exp.Ther. 130, 262 (1960).
18) I.C. Gunsalus, J.D. Lipscomb, V. Marshall, H. Frauenfelder, E. Greenbaum, E. Munk, Biological Hydroxylation Mechanisms, S. 135, Boyd Academic Press, London 1972.

19) G.A. Yu, I.C. Gunsalus, M. Katagiri, K. Suhara, J. Takemoris, J.Biol.Chem. 249, 102 (1974).
20) K. Dus, W.J. Lichtenfeld, A.G. Miguel, A. van der Hoeven, D.A. Haugen, W.L. Dean, M.J. Coon, Biochem.Biophys.Res.Commun. 60, 15 (1974).
21) R.L. Tsai, C.A. Yu, I.C. Gunsalus, J. Peisach, W. Blumberg, W.H. Orme Johnson, H. Beinert, Proc.Nat.Acad.Sci. 66, 1157 (1970).
22) W.E. Blumberg, J. Peisach, in Probes of Structure and Funktion of Macromolecules and Membranes (B. Chance, T. Yonetani, and A.S. Mildvan, eds.) 2, 215 (1971, Academic Press New York.
23) V. Ullrich, H. Sakurai, H.H. Ruf, Acta biol.med.germ. 38, 2877 (1970).
24) B.W. Griffin, J.A. Peterson, J.Biol.Chem. 250, 6445 (1975).
25) H. Schleyer, D.Y. Cooper, O. Rosenthal, Ann.N.Y.Acad.Sci. 222, 102 (1973).
26) D.Y. Cooper, S. Narashimhulu, O. Rosenthal, R.W. Estabrook in K.W. McKerns: Funktion of the Adrenal Cortex Appleton Century Crosts New York 1968.
27) J.B. Schenkmann, H. Remmer, R.W. Estabrook, Mol.Pharmakol. 3, 113 (1967).
28) A. Hildebrand, H. Remmer, R.W. Estabrook, Biochem.Biophys.Acta 171, 23 (1969).
29) J.A. Peterson, Arch.Biochem.Biophys. 144, 678 (1971).
30) H. Diehl, J. Schädelin, V. Ullrich, Hoppe Seyler's Z. Physiol.Chem. 351, 1359 (1970).
31) D.Y. Cooper, Int.Symp.Microsomes and Drug Oxidations, Tübingen, Juli 1969.
32) Y. Ishimura, V. Ullrich, J.A. Peterson, Fed.Proc.Fed. Am.Soc.Exp.Biol. 30, 1092 (1971).
33) F. Lichtenberger, W.Nastainczyk, V. Ullrich, Biochem.Biophys.Res.Commun. 70, 939 (1976).
34) E. Bayer, D. Josef, P. Krauß, H. Hagenmaier, A. Röder, A.Trebst Biochim.Biophys.Acta 143, 435 (1967).

35) A. Röder, E. Bayer, Z.Physiol.Chem. 348, 1335 (1967).
36) E. Bayer, H. Eckstein, H. Hagenmaier, D. Josef, J. Koch, P. Krauß, A. Röder und P. Schretzmann, Europ.J.Biochem. 8, 33 (1969).
37) S. Fallab,Chimia 21, 538 (1967).
38) S. Fallab, Chimia 23, 177 (1969).
39) H.J. Fenton, J.Chem.Soc. 65, 899 (1894).
40) S. Udenfriend, C.T. Clark, J. Axelrod, B.B. Brodie, J.Biol.Chem. 208, 731 (1954).
41) G.A. Hamilton, J.P. Friedman, J.Am.Chem.Soc. 85, 1008 (1963).
42) V. Ullrich, Z.Naturforschung 24b, 699 (1969).
43) D.M. Jerina, J.W. Daly, B. Witkop, Biochemistry 10, 366 (1971).
44) V. Ullrich, H.J. Staudinger, Z.Naturforschung 24b, 583 (1969).
45) E. Bayer, A. Röder, Europ.J.Biochem. 11, 89 (1969).
46) M. Chevion, J. Peisach, W.E. Blumberg, J.Biol.Chem. 252, 3637 (1977).
47) C.K. Chang, D. Dolphin, J.Am.Chem.Soc. 98, 1607 (1976).
48) T.G. Traylor, T. Mincey, Acta biol.med.germ. 38, 351 (1979).
49) V. Ullrich, J.Mol.Catal. 7, 159 (1980).
50) H. Sakurai, M. Kito, Biochem.Pharmakol. 24, 1647 (1975).
51) P. Krauß, E. Heyer, Chem.Ztg. 101, 183 (1977).
52) J.T. Groves, T.E. Nemo, R.S. Myers, J.Am.Chem.Soc. 101, 1032 (1979).
53) E. Heyer, Diplomarbeit, Universität Tübingen 1977.
54) P. Krauß, persönliche Mitteilung.
55) E. Tsuchida, H. Nishide, Adv.Polymer Sci. 24, 2 (1977).
56) G. Manecke, W. Storck, Angew.Chem. 90, 691 (1978).
57) R.E. Canfield, G.B. Anfinsen, J.Biol.Chem. 238, 2684 (1963).
58) T. Ida, K. Noda, S. Takahashi, I. Utsumi, J.Polym.Sci. 6, 215 (1963).

59) H.J. Fuhrhop, S. Besecke, W. Vogt, J. Ernst, J. Subramanian, Makromol.Chem. 178, 621 (1977).
60) Y. Lewin, M. Pecht, L. Goldstein, E. Katchalski, Biochemistry 3, 1905 (1964).
61) Y. Hashioto, T. Yamo, H.S. Mason, J.Biol.Chem. 237, 3843 (1962).
62) H.S. Mason, Ann.Rev.Biochem. 34, 595 (1965).
63) K. Muramaki, H.S. Mason, J.Biol.Chem. 242, 1102 (1967).
64) E. Bayer, H.A.O. Hill, A. Röder, R.J.P. Williams, Chem.Comm. 109 (1969).
65) J. Peisach, W.B. Mims, J.L. Davis, J.Biol.Chem. 254, 12379 (1979).
66) R.W. Estabrook in B. Hess, H.J. Staudinger "Biochemie des Sauerstoffs" Springer-Verlag, Verlin 1968, S. 186.
67) G. Wulff, Nachr.Chem.Techn. 25, 239 (1977).
68) M. Spiteller-Friedmann und G. Spiteller, Fortschr.Chem.Forsch. 12, 440 (1969).
69) Djerassi, C., Karliner, J., Aplin, R.T., Steroids 6, 1 (1966).
70) J.A. Gustafsson, B.P. Lisboa, Eur.J.Biochem. 15, 525 (1970).
71) E.G. Hrycay, J.A. Gustafsson, M. Ingelman-Sundberg, L. Ernster, J.Biochm. 61, 43 (1976).
72) H.C. Ford, R. Wheeler, L.L. Engel, Eur.J.Biochem. 57, 9 (1975).
73) B.P. Lisboa, J.A. Gustafsson, J. Sjövall, Eur.J.Biochem. 4, 496 (1968).
74) J.B. Jepson, P. Zaltzman, S. Udenfriend, Biochim.Biophys.Acta 62, 91 (1962).
75) A. Sakamoto, K. Inamori, Y. Sakamoto, J.Biochem.(Tokyo) 44, 649 (1957).
76) C.E. Dalgliesh, Arch.Biochem.Biophys. 58, 214 (1955).
77) A. Cier, C. Nofre, Bull.Soc.Chim.France 1523 (1959).
78) C. Nofre, A. Cier, C. Michou-Saucet, J. Parnet, C.R. Acad.Sci. 251, 811 (1960).

79) E. Stahl, H. Kaldewey, Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 323, 182 (1961).
80) S. Bartels, Zulassungsarbeit Universität Tübingen 1979.
81) A.D. Rahimtula, P.J. O'Brien, Eur.J.Biochem. 77, 201 (1977).
82) P. Mohr, M. Kühn, E. Weslus, R. Renneberg, R. Scheller, Acta.biol.med.germ. 38, 495 (1979).
83) J.T. Groves, W.J. Kruiper, Th.E. Nemo, R.S. Myers, J.Mol.Catal. 7, 169 (1980).
84) D. Mansuy, J.F. Bartoli, J.C. Chottard, M. Lange, Angew.Chem. 92, 938 (1980).
85) K.R. Hanson und I.A. Rose, Accounts Chem.Res. 8, 1 (1975).
86) H. Frank, G.J. Nicholson und E. Bayer, Angew.Chem. 90, 396 (1978).
87) B. Koppenhöfer, Dissertation Universität Tübingen 1980.
88) D.V. Parke, Biochem.J. 77, 493 (1960).
89) Organikum, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1971.
90) R.A. Heacock, M.E. Mahon, J.Chromatogr. 17, 338 (1965).
91) A. Seher, Fette u. Seifen, Anstrichmittel 61, 345 (1959).
92) A.R. Patton, P. Chism, Anal.Chem. 23, 1683 (1951).
93) R. Segura-Cardona, K. Soehring, Med.Exp. 10, 251 (1964).
94) B.P. Lisboa, J.Chromatog. 5, 351 (1961).
95) A. Sturm, H.W. Scheja, J.Chromatog. 16, 194 (1964).
96) G. Overberger , T.St. Pierre, N. Vorchheimer, I. Lee und S. Jaraslawsky, J.Am.Chem.Soc. 87, 296 (1965).
97) J.N. Hansen, Analyt.Biochem. 76, 37 (1976).
98) vgl. Karl Malcher, Dissertation Universität Tübingen 1980.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

E. Bayer, W. Braun, E. Breitmaier, M. Brendle, G. Gauglitz, F. Gönnenwein, G. Häfelinger, H. Hagenmaier, R. Hamm, M. Hanack, V. Hoffmann, G. Jung, S. Kemmler-Sack, W. König, W. Kraus, P. Krauß, H. Krüger, D. Krug, U. Kunze, E. Lindner, I.P. Lorenz, H. Machleidt, H. Mauser, E. Müller, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, G. Pausewang, A. Rieker, W. Rüdorff, W. Rundel, K. Scheffler, W. Schweizer, F.F. Seelig, H. Stegmann, J. Strähle, H. Straub, E. Stumpp, H. Suhr, W. Voelter, W. Zeil.

LEBENSLAUF

30.8.1950	geboren in Dettingen, Kreis Heidenheim als Sohn des Landwirts Emil Heyer und seiner Frau Anna, geb. Mack
1957 - 1961	Volksschule Dettingen
1961 - 1969	Hellenstein-Gymnasium Heidenheim
Juni 1969	Abitur
Oktober 1969	Aufnahme des Chemiestudiums an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Oktober 1972	Vordiplom Chemie
Juli 1976	Hauptdiplomprüfung mündlich
November 1976 bis November 1977	Diplomarbeit unter der Leitung von Herrn Privatdozent Dr. P. Krauß: "Hydroxylierungsreaktionen an Modellsystemen für Cytochrom P_{450}"
Januar 1978 bis Oktober 1980	Experimenteller Teil der Dissertation am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen unter der Leitung von Herrn Privatdozent Dr. P. Krauß: "Hochmolekulare Eisen-Porphyrinkomplexe mit axialen N- und S-Liganden. Synthese, Spektroskopische Eigenschaften, Hydroxylierungsreaktionen."
September 1978	Hochzeit mit Helga, geb. Ulmer
März 1979	Geburt unseres Sohnes Mathias